

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 33/00

A61K 47/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03816323.3

[43] 公开日 2005年9月14日

[11] 公开号 CN 1668314A

[22] 申请日 2003.5.16 [21] 申请号 03816323.3

[30] 优先权

[32] 2002.5.17 [33] US [31] 60/381,527

[86] 国际申请 PCT/US2003/015263 2003.5.16

[87] 国际公布 WO2003/096977 英 2003.11.27

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.10

[71] 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

共同申请人 联邦高等教育系统匹兹堡大学

[72] 发明人 利奥·E·奥特拜因

奥古斯丁·M·K·乔伊

布赖恩·朱克布朗

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书2页 说明书29页 附图21页

[54] 发明名称 治疗肝炎的方法

[57] 摘要

本发明涉及治疗患者的肝炎的方法，包括将包含一氧化碳的药物组合物给药患者。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 治疗患者的肝炎的方法，所述方法包括：
鉴定诊断为患有肝炎的患者；和
- 5 将包含一氧化碳的药物组合物给药该患者，所述一氧化碳的量是治疗患者肝炎的有效量。
 2. 权利要求1的方法，其中所述药物组合物是气体形式，并通过吸入给药所述患者。
 3. 权利要求1的方法，其中所述药物组合物是液体形式，并通过口服
 - 10 给药所述患者。
 4. 权利要求1的方法，其中所述药物组合物直接给药患者的腹腔。
 5. 权利要求1的方法，其中所述患者被选自下组的病毒感染：甲型肝炎病毒，乙型肝炎病毒，丙型肝炎病毒，丁型肝炎病毒，戊型肝炎病毒和庚型肝炎病毒。
 - 15 6. 权利要求1的方法，其中所述患者是嗜酒者。
 7. 权利要求1的方法，还包括给予患者选自以下的治疗：停止或者减少给药诱导肝炎的药物；并将皮质类固醇或抗病毒剂给药所述患者。
 8. 权利要求1的方法，其中所述药物组合物通过人工肺给药。
 9. 权利要求1的方法，其中将所述药物组合物通过体外膜气体交换装
 - 20 置给药。
 10. 权利要求1的方法，其中所述肝炎由暴露于肝毒性剂而造成。
 11. 治疗患者的肝炎的方法，所述方法包括：
 - (a) 鉴定患有或易患肝炎的患者；
 - (b) 提供含有加压气体的容器，所述加压气体包含一氧化碳气体；
 - 25 (c) 从所述容器中释放加压气体，以形成含有一氧化碳气体的环境；并
 - (d) 将所述患者暴露于该环境，其中环境中一氧化碳的量足以治疗患者的肝炎。
 12. 将肝毒性药物给药患者的方法，所述方法包括：
 - (a) 将所述肝毒性药物给药所述患者；和
 - 30 (b) 在(a)之前，期间，或之后，给药该患者包含一氧化碳的药物组合物，所述一氧化碳的量为治疗该患者肝炎的有效量。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述一氧化碳在步骤(a)前给药。
14. 权利要求 12 的方法，其中所述一氧化碳在步骤(a)期间给药。
15. 权利要求 12 的方法，其中所述一氧化碳在步骤(a)后给药。
16. 权利要求 12 的方法，其中所述肝毒性药物选自：异烟肼，甲基多巴，对乙酰氨基酚，胺碘酮和呋喃坦丁。
17. 含有医用级压缩一氧化碳气体的容器，所述容器带有表明该气体可用来治疗患者的肝炎的标签。
18. 权利要求 17 的容器，其中所述一氧化碳气体和含氧的气体混合。
19. 权利要求 17 的容器，其中混合物中的一氧化碳气体的浓度至少约
10 0.025%。
20. 权利要求 17 的容器，其中混合物中的一氧化碳气体的浓度至少约
0.05%。
21. 权利要求 17 的容器，其中混合物中的一氧化碳气体的浓度至少约
0.10%。
- 15 22. 权利要求 17 的容器，其中的混合物中的一氧化碳气体的浓度至少
约 1.0%。
23. 权利要求 17 的容器，其中的混合物中的一氧化碳气体的浓度至少
约 2.0%。
24. 权利要求 17 的容器，其中所述标签进一步表明所述气体可与肝毒
20 性药物联合给药患者。
25. 含有医用级压缩一氧化碳气体的容器，所述容器带有表明该气体
可与肝毒性药物联合给药患者的标签。
26. 治疗患者的肝炎的方法，所述方法包括：
鉴定患有或易患肝炎的患者，其中所述肝炎不是由手术或内毒素造成
25 的；和
将包含一氧化碳的药物组合物给药该患者，所述一氧化碳的量为治疗
患者肝炎的有效量。

治疗肝炎的方法

5 相关申请的参考

本申请要求 2002 年 5 月 17 日提交的美国临时申请 60/381,527 的优先权，其全文内容包含在本文中作为参考。

联邦政府资助研究的声明

10 本发明是在政府的支持下进行的，美国国立卫生研究院(NIH)许可号为 R01-44100，HL58688，HL55330 和 AI42365。政府对本发明具有一定的权利。

技术领域

15 本发明涉及治疗肝炎。

背景技术

一氧化碳(CO)气体在高浓度时是有毒的。然而，现在认识到它是一种重要的信号分子(Verma 等，Science259: 381-384, 1993)。已有提示表明一
20 氧化碳作为脑内的神经元信使分子(Id.)和下丘脑内的神经内分泌调节因子起作用(Pozzoli 等., Endocrinology 735: 2314-2317,1994)。和一氧化氮(NO)一样，一氧化碳是平滑肌的松弛剂(Utz 等，Biochem Pharmacol. 47: 195-201, 1991; Christodoulides 等，Circulation 97: 2306-9, 1995)并且抑制血小板的聚集(Mansouri 等，Thromb Haemost. 48: 286-8, 1982)。在一些模型中，吸入
25 低水平的一氧化碳显示具有抗炎效果。

肝炎是一种特征为肝的炎症的疾病。所述炎症可通过肝小叶的弥漫状或片状坏死表征。肝炎的致病因子包括，例如病毒，例如特定的肝炎病毒，例如甲型，乙型，丙型，丁型，戊型和庚型肝炎病毒；酒精；和其它药物(例
30 如异烟肼(isoniazid)，甲基多巴(methyldopa)，对乙酰氨基酚(acetaminophen)，胺碘酮(amiodarone)和呋喃坦丁(nitrofurantoin)(见 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17 版，第 42 章，第 4 部分)。

发明简述

本发明部分基于这样的发现：给药 CO 可阻止肝炎的发展。

相应地，本发明涉及治疗，预防，或降低患者患肝炎风险的方法。所述方法包括鉴定诊断为患有或易患肝炎的患者(例如诊断为患有或易患肝炎的患者)，以及给药该患者包含有效治疗患者的肝炎的量的一氧化碳的药物组合物。

药物组合物可通过本领域已知的任何将气体和/或液体给药患者的方法给药患者，例如通过吸入，吹入，输注，注射，和/或摄取。例如，在本发明的一个实施方案中，所述药物组合物通过吸入给药患者。在另一实施方案中，所述药物组合物通过口服给药患者。在另一实施方案中，将所述药物组合物直接给药患者的腹腔。在另一实施方案中，所述药物组合物通过体外膜气体交换装置(extracorporeal membrane gas exchange device)或人工肺给药患者。在另一实施方案中，所述患者是嗜酒者(alcoholic)。

所述患者可以是动物，人或非人。例如，所述患者可以是任何哺乳动物，例如人，其它灵长类，猪，啮齿类例如小鼠和大鼠，兔，豚鼠，仓鼠，母牛，马，猫，狗，绵羊和山羊。肝炎可以是多种因素的结果，或者人被认为可能由于所述多种因素患上肝炎，所述因素例如，感染(如甲型，乙型，丙型，丁型，戊型和/或庚型肝炎病毒的感染)；饮酒(例如酗酒)；药物使用(例如一种或多种以下药物：例如对乙酰氨基酚，麻醉药，抗肺结核药物，抗真菌剂，抗糖尿病药物，神经抑制药物，以及用于治疗 HIV 感染和 AIDS 的药物)；自身免疫性疾病(例如自身免疫性肝炎)；和/或外科手术。所述药物组合物可以是任何形式，例如气体形式或液体形式。

在另一实施方案中，所述方法还包括给予所述患者至少以下治疗之一：在患者体内诱导 HO-1 或铁蛋白；在患者体内表达重组 HO-1 或铁蛋白；以及将包含 HO-1，胆红素，胆绿素，铁蛋白，去铁铁蛋白，铁，去铁敏(desferoxamine)或铁葡聚糖的药物组合物给药该患者。还涉及 CO 和上述试剂之一在制备治疗或预防肝炎的药物中的用途。

在另一实施方案中，肝炎(或患肝炎的危险性)不是由手术(例如腹部或移植手术)，细菌内毒素，败血症性休克，和/或系统性感染造成的。

另一方面，本发明涉及治疗或预防患者的肝炎的方法，其包括以下步骤：鉴定患有或易患肝炎的患者(例如诊断为患有或易患肝炎的患者)，提供包含含有一氧化碳气体的加压气体的容器，将所述加压气体从所述容器中释放出来以形成包含一氧化碳气体的环境，以及将所述患者暴露于该环境，

5 所述环境中一氧化碳的量足以治疗患者的肝炎。

本发明另一方面涉及对患者进行腹部手术例如肝移植的方法，所述方法包括鉴定需要腹部手术(其中所述腹部手术可能导致肝炎)的患者；对所述患者进行腹部手术，并且在进行该步骤前，期间，或以后使所述患者吸入足以降低患者患肝炎的可能性的量的一氧化碳气体。还涉及 CO 在制备用于

10 治疗或预防肝炎药物，例如气体或液体药物中的用途。

本发明还涉及治疗患有或易患不是由手术和/或内毒素导致的肝炎(例如由本文所述任何除手术和/或内毒素导致的肝炎)的患者的肝炎的方法。所述方法包括鉴定患有或易患不是由手术和/或内毒素导致的肝炎的患者，并将包含治疗所述患者的肝炎的有效量的一氧化碳的药物组合物给药所述患

15 者。

本发明还涉及将诱导肝炎的药物(例如肝毒性药物，例如异烟肼，甲基多巴，对乙酰氨基酚，胺碘酮或呋喃坦丁)给药患者的方法。所述方法包括将所述药物给药该患者，并在给药所述药物之前，期间或以后将包含治疗所述患者的肝炎的有效量的一氧化碳的药物组合物给药该患者。

另一方面，本发明提供了包含医用级压缩 CO 气体的容器。所述容器带有表明该气体可用来治疗患者的肝炎的标签。可选或此外，所述容器还带有表明该气体可以和诱导肝炎的药物(即肝毒性药物)例如对乙酰氨基酚联合给药患者的标签。CO 气体可以与氮气混合，与一氧化氮和氮气混合，或者与含氧的气体混合。CO 气体在混合物中的浓度可以是至少约 0.025%，例

20 如至少约 0.05%，0.10%，0.50%，1.0%，2.0%，10%，50%，或 90%。

本发明还涉及 CO 在制备治疗或预防肝炎的药物中的用途。所述药物也可根据本发明所述的方法用于治疗患有或易患肝炎的患者的肝炎的方法中。所述药物可以是本文所述的任何形式，例如液体或气体 CO 组合物。

除非另有限定，本文的所有技术和科学术语具有的含义和本发明所属

30 领域的熟练技术人员通常所理解的一样。适宜的方法和材料在下文中描述，但与其类似或对等的方法和材料也可用于本发明的实践和检测中。所有公

开出版物, 专利申请, 专利, 和其它本文提到的参考文件的全文内容都包含在本文中作为参考。如果有冲突, 以本说明书, 包括其中的定义在内为准。所述材料, 方法和实施例只作为举例, 而不是意图作为限制。

本发明的一个或多个实施方案的细节在以下说明中详述。本发明的其它特征, 目的, 和优点从说明书和权利要求书中明显可见。

附图说明

图 1 是柱图, 其显示诱导 HO-1 防止小鼠肝细胞由于 TNF- α /D-gal 的诱导而出现细胞死亡。CoPP=钴原卟啉; ALT = 血清丙氨酸氨基转移酶; TNF = 肿瘤坏死因子 α 。结果显示为 6-8 只小鼠/组的均值 \pm SD, * P<0.005。

图 2 是柱图, 其显示外源性 CO 防止肝细胞由于 TNF- α 的诱导而以 cGMP/p38 途径依赖的方式和 NF- κ B 活化依赖的方式出现细胞死亡。CO=一氧化碳; Air = 室内空气; TNF = 肿瘤坏死因子 α ; BAY=BAY 11-7082(抑制 NF- κ B 活化); I κ B = I κ B α (阻止 NF- κ B 活化); ODQ = 1H-(1,2,4)- α -二唑并(oxadiazolo)-(4, 3-a)喹喔啉(quinoxalin)-1-酮(选择性鸟苷酸环化酶抑制物); Lac-Z = pIEP-Lac-Z(腺病毒对照)。结果显示为四次独立试验的三个重复孔的均值 \pm SD(* P<0.01)。

图 3 是柱图, 显示外源性 CO 防止人肝细胞受到 TNF- α /放线菌素-D(ActD)诱导而出现细胞死亡。CO=一氧化碳; Air = 室内空气; TNF = TNF- α /ActD。结果显示为三次独立试验的重复孔的均值 \pm SD。* P<0.05。

图 4 是柱图, 显示外源性 CO 导致肝细胞中 NF- κ B 的活化增加。CO=一氧化碳; Air = 室内空气; BAY=BAY 11-7082; CM = 细胞因子混合物(TNF- α (500U/ml), IL-1 β (100U/ml), 以及 IFN- δ (100U/ml))。结果显示为三次独立试验的重复孔的均值 \pm SE。相对于空气的* P<0.001。

图 5 是聚丙烯酰胺凝胶的图片, 显示了外源性 CO 诱导 NF- κ B 核易位以及 DNA 结合的增加, 这是通过电泳位移分析(EMSA)测定的。FP = 游离(free)探针(没有核蛋白, 因此无 DNA 结合); TOTAL = 没有抗体超位移(supershift)的 NF κ B 带。

图 6A-6C 是经过免疫染色(以检测 p65 的细胞核定位)的原代肝细胞的显微照相, 显示了外源性 CO 导致肝细胞中 NF- κ B 的活化增加。图 6A: 暴露于空气的肝细胞。图 6B: 暴露于细胞因子混合物(TNF- α (500U/ml), IL-1

β (100U/ml), 以及 IFN- δ (100U/ml)的肝细胞。图 6C: 暴露于 CO 的肝细胞。图像代表 6 个不同的视野。柱表示 10 μ m。

图 7 是柱图, 显示外源性 CO 诱导的对肝细胞的保护与 NF- κ B 依赖的 iNOS 表达有关。CO=一氧化碳; Air = 室内空气; BAY=BAY 11-7082; CM= 5 细胞因子混合物。显示的结果是来自四次独立试验的三个重复孔的平均值 \pm SE。相对于空气和空气/BAY 处理的细胞而言, * P<0.001。

图 8 是 Western 印迹的图, 显示与单独暴露于 TNF- α 相比, 在 CO 存在下将肝细胞暴露于 TNF- α , 所述肝细胞中 iNOS 蛋白的表达明显升高。iNOS = 可诱导的一氧化氮合酶; CO=一氧化碳; Air = 室内空气; TNF= TNF-
10 α /ActD; β -肌动蛋白=对照蛋白。所述免疫印迹代表三次独立试验。

图 9 是柱图, 显示 iNOS 活性缺陷的小鼠(*inos*^{-/-})的肝细胞不受到 CO 针对 TNF- α 诱导的细胞死亡的保护。CO=一氧化碳; Air = 室内空气; TNF= TNF-
15 α /ActD; *inos*^{-/-} = iNOS 剔除小鼠; L-NIO=L-N5-(1-亚氨基乙基)鸟氨酸-2HCl。结果显示为四次独立试验的三个重复孔的平均值 \pm SE。相对于非 TNF/ActD 和 CO/TNF/ActD-处理的细胞, * P<0.01。

图 10 是柱图, 显示外源性给予的 CO 阻止小鼠中 TNF- α /D-Gal 诱导的肝损伤。ALT=血清丙氨酸氨基转移酶; CO=一氧化碳; Air = 室内空气。结果表示为 18-20 只小鼠的均值 \pm SD。相对于空气处理的细胞, * P<0.001。

图 11A-11H 是肝样品的显微照相, 显示外源性给予的 CO 阻止小鼠中
20 TNF- α /D-Gal 诱导的肝损伤。图 11A 和 11B: 分别将来自小鼠的肝样品暴露于室内空气和 CO, 并用苏木精(haematoxylin)和伊红 (H&E) 染色。图 11C 和 11D: 将 TNF- α /D-Gal 处理后小鼠的肝样品分别暴露于室内空气和 CO, 并用 H&E 染色。图 11E 和 11F: 将 TNF- α /D-Gal 处理后小鼠的肝样品分别暴露于室内空气和 CO, 并对其染色以检测活化的 caspase-3。图 11G
25 和 11H: 将 TNF- α /D-Gal 处理后小鼠的肝样品分别暴露于室内空气和 CO, 且用脱氧核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)进行染色。所示图像是来自每组 4 只小鼠个体的 15-20 个切片/肝中的代表性切片。柱表示 20 μ m。

图 12 是 Western 印迹的图, 显示暴露于 TNF- α /D-Gal 并用吸入 CO 处
30 理的小鼠的肝显示 iNOS 蛋白水平增加。野生型 = 野生型小鼠; iNOS^{-/-}=iNOS

缺陷的小鼠；CO=一氧化碳；Air = 室内空气；TNF=TNF- α /D-Gal； β -肌动蛋白 = 对照蛋白。

图 13A-13D 是肝样品的显微照相，显示暴露于 TNF- α /D-Gal 并用吸入 CO 处理的小鼠的肝显示 iNOS 蛋白水平增加。图 13A：暴露于空气的小鼠的肝样品。图 13B：暴露于 CO 的小鼠的肝样品。图 13C：暴露于 TNF- α /D-Gal 和室内空气的小鼠的肝样品。图 13D：暴露于 TNF- α /D-Gal 和 CO 的小鼠的肝样品。图中所示为 6 只独立动物和 6-10 个不同的切片/肝样品的代表性结果。柱表示 20 μ m。

图 14 是柱图，显示 CO 在缺乏 iNOS 功能/表达时对肝损害没有保护作用。L-NIL = L-N6(1-亚氨基乙基)-赖氨酸-二氢氯化物(iNOS 的选择性抑制物)；CO=一氧化碳；Air = 室内空气；TNF=TNF- α /D-Gal。结果显示为 6-8 只动物/组的均值 \pm SD。相对于 CO/TNF- α /D-Gal 以及空气和 CO 对照，* P<0.01。

图 15 是 Western 印迹的图，表明 CO 处理的小鼠的肝在存在或缺失 TNF- α /D-Gal 时均显示 HO-1 的表达增加。CO=一氧化碳；Air = 室内空气；TNF=TNF- α /D-Gal； β -肌动蛋白 = 对照蛋白。印迹是两个独立试验的代表性结果。

图 16 是 Western 印迹的图，表明如果用 L-NIL 抑制 iNOS，CO 处理的小鼠的肝在存在或缺失 TNF- α /D-Gal 时均显示 HO-1 的表达增加。CO=一氧化碳；Air = 室内空气；TNF=TNF- α /D-Gal； β -肌动蛋白 = 对照蛋白；L-NIL = L-N6(1-亚氨基乙基)-赖氨酸-二氢氯化物(iNOS 的选择性抑制物)。印迹是两个独立试验的代表性结果。

图 17 是柱图，显示 CO 诱导的 HO-1 阻止小鼠中 TNF- α 诱导的肝损伤。ALT=血清丙氨酸氨基转移酶；Air = 室内空气；TNF=TNF- α /D-Gal；Sn = 锡原卟啉(HO-1 的抑制物)；VP=V-PYRRO(氧化氮供体)。结果表示为 8-10 只小鼠/组的均值 \pm SD。相对于 CO/TNF/D-Gal 处理的小鼠，* P<0.05。

图 18 是柱图，显示 HO-1 的诱导防止不依赖于 iNOS 活性的 TNF- α 诱导的肝损害。ALT=血清丙氨酸氨基转移酶；Air = 室内空气；TNF=TNF- α /D-Gal；L-NIL = L-N6(1-亚氨基乙基)-赖氨酸-二氢氯化物(iNOS 的选择性抑制物)；CoPP = 钴原卟啉(HO-1 的诱导物)；iNOS^{-/-}=iNOS 缺陷的小鼠。结果显示为 6-8 只小鼠/组的均值 \pm SD。相对于 Air/TNF 和 L-NIL/TNF，* P<0.001。

图 19 是柱图, 显示 HO-1 的表达是 CO 诱导的保护作用(防止小鼠肝细胞由于 TNF- α /D-gal 的诱导而出现细胞死亡)所需的。野生型(黑柱)=从野生型 C57BL/6J 小鼠分离的肝细胞; *homx-1*^{-/-}(白柱)=从 HO-1 裸鼠中分离的肝细胞; CO=一氧化碳; Air = 室内空气; TNF- α =TNF- α /ActD。相对于 CO 处理过的非 TNF- α /ActD 处理的细胞和 TNF- α /D-Gal 处理的细胞, * P<0.01。

图 20 是柱图, 显示显示 HO-1 的表达是 CO 诱导的保护作用(防止小鼠肝细胞由于 TNF- α /ActD 的诱导而出现细胞死亡)所需的。野生型(黑柱)=从野生型 C57BL/6J 小鼠分离的肝细胞; *homx-1*^{-/-}(白柱)=从 HO-1 裸鼠中分离的肝细胞; SNAP=另(s)-亚硝基-N-乙酰基-青霉胺(NO 供体); Air = 室内空气; TNF=TNF- α /ActD。相对于非 TNF- α /ActD 处理的细胞和 TNF- α /ActD 处理也用 NO 处理过的的细胞, * P<0.01。

图 21 是柱图, 显示暴露于 CO 的小鼠不受对乙酰氨基酚诱导的肝损伤。ALT=血清丙氨酸氨基转移酶; Air = 室内空气; APAP = 对乙酰氨基酚。结果显示为 4-8 只小鼠/组的均值 \pm SD。

发明内容

本文术语“一氧化碳”(或“CO”)描述了气态的, 加压成液态的, 或者溶解于水溶液中的分子一氧化碳。本说明书术语“一氧化碳组合物”或“包含一氧化碳的药物组合物”用于描述可给药患者和/或器官例如肝的、含有一氧化碳的气体或液体组合物。熟练医师(practioner)知道在具体应用中, 优选何种形式的药物组合物, 例如气体, 液体, 或气体和液体的形式。

本文术语“有效量”和“有效地治疗”指一段时间内(包括急性或慢性给药以及定期的或连续的给药)给药一定量或浓度的一氧化碳, 所述量或浓度在其给药用来产生目的效果或生理结果的背景下是有效的。本发明所用有效量的一氧化碳包括例如预防肝炎, 降低患肝炎的可能性, 减轻肝炎症状, 或者改善其它肝炎治疗的效果的量。

在气体的情况下, 有效量的 CO 通常在约 0.0000001% 到约 0.3% 重量之间, 例如 0.0001% 到约 0.25% 重量, 优选 CO 重量至少约 0.001%, 例如至少 0.005%, 0.010%, 0.02%, 0.025%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.08%, 0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.22%, 或 0.24% 重量。优选的范围包括, 例如 0.001%

到约 0.24%，约 0.005%到约 0.22%，约 0.005%到约 0.05%，约 0.010%到约 0.20%，约 0.02%到约 0.15%，约 0.025%到约 0.10%，或约 0.03%到约 0.08%，或约 0.04%到约 0.06%。优选的在 CO 溶液的情况下，有效量通常在约 0.0001 到约 0.0044g CO/100g 溶液，例如至少 0.0001, 0.0002, 0.0004, 5 0.0006, 0.0008, 0.0010, 0.0013, 0.0014, 0.0015, 0.0016, 0.0018, 0.0020, 0.0021, 0.0022, 0.0024, 0.0026, 0.0028, 0.0030, 0.0032, 0.0035, 0.0037, 0.0040, 或 0.0042g CO/100g 水溶液。优选的范围包括，例如约 0.0010 到约 0.0030g CO/100g 液体，约 0.0015 到约 0.0026g CO/100g 液体，或者约 0.0018 到约 0.0024g CO/100g 液体。熟练的医师应理解根据应用的情况可使用这些范围 10 外的量。

本说明书所用术语“患者”描述根据本发明提供的方法对其进行治疗的动物，人或非人。本发明涉及兽医学应用。该术语包括但不限于哺乳动物，例如人，其它灵长类，猪，啮齿类例如小鼠和大鼠，兔子，豚鼠，仓鼠，牛，马，猫，狗，绵羊和山羊。本文术语“治疗”是指延缓患者病情 15 的发生，抑制，预防或缓解患者疾病(例如肝炎)的影响。

本文术语“肝炎”是本领域已知的术语，在文中指患者以肝炎症为部分特征的疾病。肝炎的致病因子包括，例如感染，如具体肝炎病毒的感染，如甲型，乙型，丙型，丁型，戊型和庚型肝炎病毒的感染；或肝毒性制剂，例如肝毒性药物(例如，异烟肼，甲基多巴，对乙酰氨基酚，胺碘酮，和咪 20 喃坦丁)，和毒素(例如内毒素或环境毒素)。肝炎可见于在手术后的肝移植患者。其它可导致肝炎的药物和毒素(即，肝毒性制剂)的实例见 Feldman: Sleisenger&Gordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 第七版, 的 17 章 (Liver Diseases Caused by Drugs, Anesthetics, and Toxins)所述, 其全部内容包含在文中作为参考。这种实例包括, 但不限于, 甲基多巴和苯妥英, 巴 25 比妥类, 例如苯巴比妥; 磺胺类(例如组合药物如复方新诺明(磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)和甲氧苄啶(trimethoprim)); 柳氮磺吡啶(sulfasalazine); 水杨酸类(salicylates); 双硫醒(disulfiram); β -肾上腺能阻滞剂, 例如, 醋丁洛尔(acebutolol), 拉贝洛尔(labetalol)和美托洛尔(metoprolol); 钙通道阻滞剂, 例如硝苯地平(nifedipine), 维拉帕米(verapamil)和地尔硫革(diltiazem); 合成 30 类视黄醛(retinoids), 例如依曲替酯(etretinate); 胃酸抑制药, 例如, 奥美替丁(oxmetidine), 乙溴替丁(ebrotidine), 西咪替丁(cimetidine), 雷尼替丁

(ranitidine), 奥美拉唑(omeprazole)和法莫替丁(famotidine), 纽柯春(leukotriene)受体拮抗剂, 例如扎鲁斯特(zafirlukast); 抗肺结核药物, 例如利福平和吡嗪酰胺; 抗真菌剂, 例如酮康唑, 特比萘酚, 氟康唑, 和伊曲康唑; 抗糖尿病药物, 例如噻唑烷二酮类(thiazolidinediones), 例如曲格列酮和罗格列酮; 用于治疗神经疾病的药物, 例如神经抑制药物(neurleptic agents), 抗抑郁药(例如氟西汀(floxetine), 帕罗西汀(paroxetine), 万拉法新(venlafaxine), 曲唑酮(trazodone), 托卡朋(tolcapone), 和奈法唑酮(nefazodone), 安眠药(例如阿吡坦(alpidem), 唑吡坦(zolpidem), 和本他西洋(bentazepam)), 以及其它药物, 例如单满吡啶氨(tacrine), 硝苯呋海因(dantrolene), 利鲁唑(riluzole), 替扎尼啶(tizanidine)和双苯丙乙胺(alverine); 非类固醇类抗炎药, 例如溴芬那酸(bromfenac); COX-2 抑制物; 醋酸环丙孕酮酯(cyproterone acetate); 来氟诺米(leflunomide); 抗病毒剂, 例如非阿尿昔(fialuridine), 地达诺新(didanosine), 扎西他宾(zalcitabine), 司他夫定(stavudine), 拉米夫定(lamivudine), 齐多夫定(zidovudine), 阿波卡韦(abacavir); 抗癌药, 例如他莫昔芬和甲胺蝶呤, 毒品(recreational drug), 例如可卡因, 苯环利定(phencyclidine), 和 5-甲氧基-3,4-亚甲基二氧脱氧麻黄碱(methylenedioxymethamphetamine); L-天冬酰胺酶; 阿莫地喹(amodiaquine); 海葱酮(hycanthone); 麻醉剂; 例如氟烷(halothane), 安氟醚(enflurane)和异氟醚(isoflurane); 维生素, 例如维生素 A; 以及饮食和/或环境毒素, 例如吡咯烷士啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids), 来自毒鹅膏菌(Amanita phalloides)或其它毒蘑菇的毒素, 黄曲霉素(aflatoxin), 砷(arsenic), Bordeaux 混合物(铜盐和石灰), 氯乙烯单体(vinyl chloride monomer), 四氯化碳(carbon tetrachloride), 铍(beryllium), 二甲基甲酰胺(dimethylformamide), 二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine), methylenedianiline, 磷, 十氯酮(chlordecone)(Kepone), 2, 3, 7, 8-四氯-二苯并(dibenzo)p-二氧(杂)芘(dioxin)(TCDD), 四氯乙烷, 四氯乙烯, 2,4,5-三硝基甲苯, 1,1,1-三氯乙烷, 甲苯和二甲苯, 以及已知的“草药”, 例如麻黄素和丁香油酚(eugenol)。

肝炎的症状包括疲劳, 食欲不振, 胃不适, 和/或黄疸(皮肤和/或眼睛发黄)。对肝炎更详细的描述见, 例如 The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17 版, 第 42 章, 第 4 部分, 第 44 章, 第 4 部分, 第 40 章, 和第 4 部分, 其全部内容包含在本文中作为参考。

熟练医师应理解，医师可通过本领域已知的任何方法诊断患者患有肝炎，例如通过，用例如血液检验中的血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平，碱性磷酸酶(AP)水平，和胆红素水平来评估肝功能。

认为可能出现肝炎的个体尤其可从本发明受益，主要是因为在出现任何肝炎的证据以前，就可以开始预防性治疗。“易患”的个体包括，例如被肝炎病毒感染的患者，或者患有本文所述任何疾病和具有本文所述的危险因素(例如暴露于肝毒性药物的患者)的个体。熟练的医师应理解通过医师的诊断可确定患者易患肝炎。

在所述患者被诊断为患有肝炎或与肝炎相关的任何疾病，或者被诊断为具有任何与该患者患肝炎的可能性增加相关的危险因素(例如所述患者近期已经，正在，或即将暴露于肝毒性制剂，例如肝毒性药物如对乙酰氨基酚)的当天，将治疗肝炎有效量的CO给药该患者。患者可吸入的CO的浓度可以从10 ppm到1000 ppm，例如，约100 ppm到约800 ppm，约150 ppm到约600 ppm，或约200 ppm到约500 ppm。优选的浓度包括，例如，约30ppm，50ppm，75ppm，100ppm，125ppm，200ppm，250ppm，500ppm，750ppm，或约1000ppm。可将一氧化碳间断或连续给药患者。可给药CO约1，2，4，6，8，10，12，14，18或20天，或者20天以上，例如1，2，3，5或6个月，或者直到所述患者被诊断为不再易患肝炎。在给定的天数内，CO可全天连续给药，或者间断给药，例如每天吸入CO一次(使用高浓度CO)，或者每天吸入达23小时，例如达20，15，12，10，6，3或2小时每天，或达1小时每天。

如果所述患者需要用肝毒性药物(例如因医师处方所开)进行治疗，所述患者可以在给药所述药物之前，期间和/或以后用CO(例如气体CO组合物)进行治疗。例如，可将CO间断或连续地给药所述患者，从给药所述药物前0到20天即开始(且当给药多种药剂时，在各单独药剂以前)，例如开始于所述给药前至少约30分钟，例如约1，2，3，5，7或10小时，或约1，2，4，6，8，10，12，14，18或20天，或者20天以上。可选或此外，可在给药所述药物的同时将CO给药所述患者。可选或此外，可在给药所述药物后将CO给药所述患者，例如在所述给药后立刻开始，并继续间断性或持续给药1，2，3，5，7或10小时，或约1，2，5，8，10，20，30，50或60天，

不定期地，或者直到医师确定不再需要给药 CO(例如当所述肝毒性药物从身体中消除或者不再对肝造成损害)。

制备气体组合物

CO 组合物可以是气体一氧化碳组合物。可用于本发明的方法中的压缩气体(compressed gas)或加压气体(pressurized gas)，可自任何商业来源获得，并可存在于任何类型的适合保存压缩气体的容器(vessel)中。例如，压缩或加压气体可以自任何提供医用压缩气体例如氧气的来源获得。本文术语“医用级”气体，指适合给药本文所定义的患者的气体。提供用于本发明的方法的包括一氧化碳的加压气体时，可使得所需的最终组合物中的所有气体(例如，CO，He，NO，CO₂，O₂，N₂)在同一容器内，除NO和O₂不能保存在一起的情况。可选的，本发明的方法可使用多个含有单一气体的容器进行。例如，可提供含或不含其它气体的含一氧化碳的单个容器，其内容物可选地与室内空气或其它容器中的内容物混合，所述其它容器例如含有氧气，氮气，二氧化碳，压缩空气，或任何其它适合的气体或其混合物的容器。

根据本发明给药患者的气体组合物通常含有0%到约79%重量的氮气，约21%到约100%重量的氧气和约0.0000001%到约0.3%重量(相当于约1ppb或0.001ppm到约3,000ppm)的CO。优选气体组合物中氮含量是约79%重量，氧含量是约21%重量，且CO量是约0.0001%到约0.25%重量。CO的量优选是至少约0.001%，例如，至少约0.005%，0.010%，0.02%，0.025%，0.03%，0.04%，0.05%，0.06%，0.08%，0.10%，0.15%，0.20%，0.22%，或0.24%重量。CO的优选范围包括约0.005%到约0.24%，约0.01%到约0.22%，约0.015%到约0.20%，约0.08%到约0.20%，和约0.025%到约0.1%重量。注意到根据应用情况，可短期(例如一次或数次呼吸)使用具有高于0.3%(例如1%或更高)的CO浓度的气体CO组合物。

可用气体CO组合物产生包含CO气体的环境(atmosphere)。包含适当水平的CO气体的环境可通过例如以下方式产生：提供含有包含CO气体的加压空气的容器，并将所述加压气体从所述容器中释放到小室(chamber)或空间内，在该小室或空间内形成包含CO气体的环境。可选地，所述气体可被释放到使该气体在呼吸面罩或呼吸管内达到最高浓度的一种仪器中，从

而在呼吸面罩或呼吸管中创造出包含 CO 气体的环境,使得患者成为该室内唯一暴露于明显水平的 CO 的人。

环境中 CO 的水平可通过本领域已知的任何方法检测或监测。这种方法包括电化学检测,气相色谱,放射性同位素计数,红外吸收,比色法,和
5 基于选择性膜的电化学方法(见例如 Sunderman 等, Clin. Chem. 28: 2026-2032, 1982; Ingi 等, Neuron 16: 835-842, 1996)。亚百万分数级(sub-parts per million)CO 水平可通过例如,气相色谱和放射性同位素计数检测。此外,本领域已知亚-ppm 范围内的 CO 水平可通过中红外气体传感器(midinfrared gas sensor)在生物组织中检测(见例如, Morimoto 等, Am. J. Physiol. Heart.
10 Circ. Physiol 280: H482-H488, 2001)。CO 传感器和气体检测仪可自多种商业来源获得。

制备液体组合物

CO 药物组合物也可以是液体 CO 组合物。液体可通过本领域已知的任何使气体溶于液体的方法制成 CO 组合物。例如,所述液体可以置于所谓的
15 “CO₂ 温育箱”中并暴露于持续的 CO 气流,优选由二氧化碳平衡,直到液体中 CO 达到所需的浓度。另一实施例中,CO 气体可直接“吹入(bubbled)”液体中,直到液体中 CO 达到所需的浓度。溶解于给定水溶液中的 CO 量随温度的降低而增加。在另一实施例中,适宜的液体可流经允许气体扩散的管道系统(tubing),该管道系统在包含 CO 的环境(例如利用如体外膜氧合器
20 (extracorporeal membrane oxygenator)的仪器)中运行。CO 扩散进入液体产生液体 CO 组合物。

很可能地,这种用于引入活动物体内的液体组合物,当其被引入动物体内时,温度为或约为 37°C。

液体可以是本领域熟练技术人员已知的任何适合给药患者的液体(参见,例如 Oxford Textbook of Surgery, Morris 和 Malt 编, Oxford University Press (1994))。通常,所述液体是水溶液。溶液的实例包括磷酸盐缓冲的盐水溶液(PBS), CelsiorTM, PerfadexTM, 柯林斯(Collins)溶液,柠檬酸盐溶液,和威斯康星大学(University of Wisconsin)(UW)溶液(Oxford Textbook of Surgery, Morris 和 Malt 编, Oxford University Press(1994))。在本发明的一个
30 实施方案中,所述液体是林格氏液(Ringer's solution),例如,乳酸盐林格氏

溶液，或任何可输注入患者体内的其它液体。在另一实施方案中，液体包括血液，例如全血。

任何适合的液体可通过气体扩散器饱和到设定的 CO 浓度。可选地，可用经质量控制含有给定水平的 CO 的预制溶液。可通过使用带有与 CO 分析仪连接的透气但不透液的膜的仪器进行测定来对剂量进行精确控制。可将溶液饱和到所需有效浓度并保持在这些水平。

用 CO 组合物治疗患者

可用本领域已知的任何将气体和/或液体给药患者的方法使用一氧化碳组合物治疗患者。一氧化碳组合物可给药诊断为，或者确定易患肝炎的患者。本发明还涉及将液体或气体一氧化碳系统地给药患者(例如通过吸入和/或摄取)，以及将所述组合物局部地给药患者的肝(例如通过导入腹腔)。

系统地递送 CO

气体 CO 组合物可系统地递送给患者，例如诊断为，或者确定易患肝炎的患者。气体 CO 组合物通常通过嘴或鼻道吸入肺内给药，在肺内 CO 很容易地被吸收到患者的血流内。治疗性气体组合物中所用活性化合物(CO)的浓度有赖于 CO 的吸收，分布，灭活和排出(通常通过呼吸)速率以及本领域熟练技术人员已知的其它因素。还应理解，对于任何具体受试者而言，具体的剂量方案应根据个体需要和实施或监督组合物给药的人员的职业判断随时间进行调整，而且前述的浓度范围只是示例性的，而不是为限制所要求的组合物的范围或实践。可监控治疗并调整 CO 剂量来确保对患者的最适治疗。本发明还涉及 CO 的急性，亚急性和慢性给药，所述给药方式有赖于例如患者肝炎的严重性或持续性。CO 可在足以治疗病情并显示预期药理学或生物学效应的一段时间内(包括不定时地给药)递送给患者。

以下是一些可用于对患者给药气体 CO 组合物的方法和器械的实例。

25 呼吸机(ventilator)

可购买医用级 CO(可有多种浓度)，所述 CO 与空气或其它含有氧气的气体混合于加压气体标准罐中(例如，21% O₂，79% N₂)。所述气体为非反应活性(non-reactive)的，而本发明方法所需浓度远远低于可燃范围(空气中 10%)。在医院中，推定要将气体递送到床边，在那里使之与氧气或室内空气在混合器(blender)内混合，达到所需的 ppm 浓度(百万分之几)。患者通过呼吸机吸入气体混合物，呼吸机的流率根据患者的舒适程度和需要来设定。

通过肺图(即呼吸速率,潮气量等)可确定该流率。可将防止患者不必要地接受超过所需量的一氧化碳的自动防故障机制(fail-safe mechanism)设计在递送系统中。患者的 CO 水平可通过研究以下指标进行监测:(1)静脉血中可测的碳氧血红蛋白 (COHb),和,(2)从呼吸机侧部收集的呼出 CO。可根据患者的健康状况和标志物调节 CO 暴露。如果有必要,还可通过吸入 100% 的氧气洗出 CO。CO 是不被代谢的,因此除很小一部分被转化成 CO₂,无论吸入多少最后都被呼出。CO 可以和任何水平的 O₂ 混合,以治疗性递送 CO 而不导致随后的低氧状况。

面罩和幕(Tent)

10 含有 CO 的气体混合物如上述方法制备,从而允许患者通过面罩或幕被动吸入。吸入浓度可改变,并通过简单地换成吸入 100% 的 O₂ 进行洗涤。可用自动防故障机制在面罩或幕或在其附近监测 CO 水平,所述自动防故障机制可防止吸入过高浓度的 CO。

便携式吸入器(Portable inhaler)

15 加压 CO 可被包装入便携式吸入器并吸入经过计量的剂量,例如使得不住院的受体接受间歇性治疗。可将不同浓度的 CO 包装到容器中。该仪器可简单到只是带有开-关阀和管子的含有稀释 CO 的小储罐(例如低于 5kg),从所述管子中,患者可根据标准方案或需要吸入 CO。

静脉内人工肺(Intravenous Artificial Lung)

20 设计为递送 O₂ 和去除 CO₂ 的人工肺(用于血液中气体交换的导管器械)可用于 CO 递送。该导管植入后,定位于一根大静脉中并可系统性递送所需浓度的 CO 或将其递送到局部位点。所述递送可以是短时间内局部递送高浓度 CO 到手术位点例如邻近肝的局部递送(所述高浓度在血流中迅速稀释),或者相对较长的时间内暴露于较低浓度的 CO(见例如, Hattler 等, *Artif. Organs* 18(11) : 806-812 (1994); 和 Golob 等, *ASAIO J.*, 47 (5): 432-437 (2001)).

正常气压小室(Normobaric chamber)

30 在某些情况下,需要将患者整体暴露于 CO。患者须位于充满 CO 的密闭舱中,其中 CO 的水平不会对患者造成危险,或者该水平造成可接受的危险但不会使旁观者处于被暴露的危险。完成暴露后,用空气(例如, 21% O₂,

79% N₂)充满该舱, 并使用 CO 分析仪分析样品, 以保证在允许患者离开暴露系统前没有任何 CO 存留。

系统性递送液体 CO 组合物

5 本发明还涉及, 可产生包含 CO 组合物的水溶液用于系统地递送给患者, 例如从口递送和 / 或输注到患者体内, 例如通过静脉内, 动脉内, 腹膜内和 / 或皮下。例如, 液体 CO 组合物, 如 CO 饱和的林格氏溶液, 它可以输注给患肝炎或易患肝炎的患者。可选或此外, 被 CO 部分或完全饱和的全(或部分)血可输注入此患者。

10 本发明还涉及应用能够递送可用的 CO 气体组合物或液体 CO 组合物的剂量的制剂(例如 CO 释放性胶, 乳膏, 软膏剂, 锭剂或膜片)。

使用一氧化碳对器官进行局部治疗

15 可选或此外, 一氧化碳组合物还可直接给药肝, 例如整个肝, 或给药肝的任何部分。气体组合物可通过本领域已知的将气体吹入患者的任何方法, 直接给药患者的肝。例如, 在腹腔镜操作中, 气体如二氧化碳通常进入患者的腹腔从而辅助检查(见例如 Oxford Textbook of Surgery, Morris 和 Malt 编, Oxford University Press (1994))。熟练医师将理解类似的方法可以用于将一氧化碳组合物直接给药患者的肝。

20 液体 CO 组合物也可局部给药患者的肝。液体形式的组合物可通过本领域已知的任何将液体给药患者的方法给药。和气体组合物一样, 液体组合物可直接给药肝。液体, 例如含有溶解的 CO 的盐水溶液, 可以在腹腔镜手术中注入患者的腹腔。熟练医师将理解类似的方法可以用于将液体一氧化碳组合物直接给药患者的肝。此外, 原位暴露可以通过使用液体一氧化碳组合物在冲洗肝或其一部分来进行(见例如 Oxford Textbook of Surgery, Morris 和 Malt 编, Oxford University Press (1994))。

25 血红素加氧酶-1, 其它化合物以及其它治疗在肝炎中的应用

本文还涉及随同一氧化碳的给药而诱导或表达血红素加氧酶-1(HO-1)。例如, HO-1 可以在患有或易患肝炎的患者体内诱导。本文术语“诱导”指用细胞本身编码蛋白的内源性(例如非重组的)基因, 造成分离的细胞或组织, 器官或动物的细胞中上述蛋白例如 HO-1 的生成增加。

30 HO-1 可通过本领域任何已知的方法在患者体内诱导。例如 HO-1 的产生可通过氯高铁血红素(hemin), 铁原卟啉, 或钴原卟啉诱导。各种非血红

素(non-heme)制剂包括重金属, 细胞因子, 激素, 一氧化氮, COCl_2 , 内毒素和热休克也强烈诱导 HO-1 表达(Otterbein 等, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279:L1029-L1037, 2000; Choi 等, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554, 1997; 和
5 Tenhunen 等, *J. Lab. Clin. Med.* 75: 410-421, 1970)。多种导致氧化物应激的制剂和条件可高度诱导 HO-1, 所述制剂和条件包括过氧化氢, 谷胱甘肽耗竭物, UV 辐射和氧过多(Choi 等, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554, 1997; and Keyse 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 99-103, 1989)。“包含 HO-1 诱导物的药物组合物”
10 指包括任何能够在患者体内诱导 HO-1 的试剂的药物组合物, 例如任何上述的试剂, 例如 NO, 氯高铁血红蛋白, 铁原卟啉, 和/或钴原卟啉。

通过基因转移可增加细胞中 HO-1 的表达。本文术语“表达”指通过外源给药基因(例如重组基因)造成分离的细胞或组织, 器官或动物的细胞中的蛋白生成增多, 所述蛋白例如 HO-1 或铁蛋白。HO-1 或铁蛋白优选是与受体的同一物种的(例如人, 小鼠, 大鼠等), 从而最小化任何免疫反应。可通过组成型启动子(例如巨细胞病毒启动子)或组织特异的启动子(例如用于哺乳动物细胞的乳清蛋白启动子或用于肝细胞的白蛋白启动子)驱动表达。编码 HO-1 或铁蛋白的适宜基因治疗载体(例如逆转录病毒, 腺病毒, 腺伴随病毒(AAV), 痘病毒(例如痘苗病毒), 人类免疫缺陷病毒(HIV), 小鼠极小病毒(minute virus of mice), 乙型肝炎病毒, 流感病毒, 单纯疱疹病毒-1 型, 和慢病毒)可通过口服, 吸入或注入肝来给药患有或易患肝炎的患者。类似的, 编码 HO-1 或去铁铁蛋白的质粒载体可作为例如裸露的 DNA 的形式, 位于脂质体中的形式, 或位于微颗粒中的形式给药。
15
20

此外, 外源性 HO-1 蛋白可通过本领域已知的任何方法直接给药患者。外源性 HO-1 可直接给药, 作为上述在患者体内诱导或表达 HO-1 的方法的补充或替换。所述 HO-1 蛋白可在脂质体内, 和/或作为融合蛋白例如 TAT 融合蛋白(见例如, Becker-Hapak 等, *Methods* 24: 247-256, 2001)的形式递送患者。
25

可选或此外, HO-1 的任何代谢产物例如胆红素, 胆绿素, 铁, 和/或铁蛋白可与一氧化碳联合给药患者, 以防止或治疗肝炎。此外, 本发明涉及将除铁蛋白以外的铁结合分子, 例如去铁敏(desferoxamine)(DFO), 铁右旋
30

糖苷，和/或去铁铁蛋白，给药患者。本发明还涉及可抑制催化任何这些产物降解的酶(例如胆绿素还原酶)以创造/增强所需的效果。上述任何物质均可给药，例如经口服，静脉内，腹膜内，或直接给药肝。

5 本发明的方法中也可以使用在给药化合物后，将 CO 释放到机体的化合物(例如释放 CO 的化合物，如光可激活的的释放 CO 的化合物)，例如十羰基二锰(dimanganese decacarbonyl)，三羰基二氯钨(II)二聚体，和二氯甲烷(例如，在 400-600 mg/kg 之间，例如约 500mg/kg 的剂量)，也可以在本发明方法中使用碳氧血红蛋白以及供给 CO 的血红蛋白替代物。

10 可以以任何方式给药患者上述任何物质，例如通过口服，静脉内，或动脉内给药。上述任何化合物可局部和/或系统地给药患者，并且可以联合给药。

15 本发明还涉及通过将 CO 与任何其它已知治疗肝炎的方法或化合物联合给药所述患者来治疗/预防肝炎，停止或减少给药致病药物；将皮质类固醇类和/或 α -干扰素或其它抗病毒制剂给药所述患者；和/或对患者进行手术，例如肝移植。

以下实施例说明了本发明的一部分，所述实施例不应理解为从任何方面限制本发明。

实施例 1 一氧化碳减弱肝损害

20 动物

雄性 C57BL/6J(Charles Rivers Laboratories, Bar Harbor, ME)，8-12 周大小的 *inos^{-/-}*小鼠和野生型同窝幼仔(在 Pittisburgh 大学喂养/寄存)用于体内试验中。

急性肝炎损伤模型

25 将 TNF- α /D-gal(分别为 0.3 μ g/8mg/小鼠，腹膜内)给药多组小鼠。根据试验条件，一些小鼠接受 CO(250ppm)，选择性 NO 供体 O₂-乙烯基 1-(吡咯啉-1-基)二氮烯-1-鎓-1,2-二醇盐 (O₂-vinyl 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate) (V-PYRRO; 10mg/kg 皮下注射 (s.c.)，Alexis Biochem., San Diego, CA)或钴原卟啉(CoPP, 5mg/kg, 腹膜内 30 (i.p.)，Frontier Scientific, Logan, UT)。此外，必要时，给药 iNOS L-N6-(1-亚氨基乙基)-赖氨酸-二氢氯化物(L-NIL; 5mg/kg, 腹膜内，Alexis

Biochemicals)或 HO-1 抑制物锡原卟啉(Snpp; 50 μ mol/kg, 腹膜内, Frontier Scientific)。必要时, 给药(500mg/kg, 腹膜内)对乙酰氨基酚(Sigma Chem. Co.; St Louis, MO)。

肝细胞培养

- 5 小鼠原代肝细胞获自 C57BL/6J, *mmk3*^{-/-}, *inos*^{-/-}(圈养群)或 *hmox-1*^{-/-}小鼠, 如 Kim 等所述(J.Biol.Chem.272:1402-1411(1997))。收获后 1-3 天使用肝细胞。

诱导肝细胞死亡/凋亡

- 10 细胞用 TNF- α (10ng/ml) 和放线菌素 -D(Act-D ; 200ng/ml, SigmaChemical Co.St.Louis, MO)处理以诱导细胞死亡。TNF- α / ActD 处理已经显示在原代肝细胞中可诱导细胞死亡, 尤其是凋亡(见, 例如 Kim 等(J.Biol.Chem.272:1402-1411(1997))。使用 CO, NO 供体另(s)-亚硝基-N-乙酰基-青霉胺(SNAP; 250-750 μ M)和/或其它指定的药剂来处理肝细胞。TNF- α / ActD 处理 12 小时后, 洗涤细胞, 并用结晶紫染色, 以如前述(Id.)测定细胞生存力。必要时, 给药 iNOS 的选择性体外抑制物, L-N5-(1-亚氨基乙基)鸟氨酸-2HCl(LNIO; 1-2mM; Calbiochem, San Diego, CA)。
- 15

基因转移/质粒

- 20 在一些实验中, 利用腺病毒载体(10pfu/细胞)对 I κ B α 抑制物(Hellerbrand 等, Hepatology, 27: 1285-1295(1998))或 β -半乳糖苷酶进行基因转移是在 TNF- α / ActD 处理前 12 小时。NF- κ B 活化利用萤光素酶报道物分析评估, 如 Chow 等所述(J.Biol.Chem.274:10689-10692(1999))。简而言之, 按产品说明, 利用 LipofectinTM(Invitrogen, Carlsbad, CA)将肝细胞用 NF- κ B 受体构建体(pGL3-kappa β 萤光素酶, 100ng/孔; 和 pIEP-Lac-z 0.5 μ g/孔)共转染。利用萤光素酶报道物分析(reporter assay)进行 iNOS 表达的评估, 如 Lowenstein 等所述 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 25 90:9730-9734(1993))。简言之, 如上述将肝细胞用 iNOS 启动子报道物构建体(pXP2; 1 μ g/孔)和 pIEP-LacZ(0.5 μ g/孔)进行共转染。

萤光素酶报道物分析

- 30 如上述用质粒转染肝细胞, 并在转染后 24 小时使用各种刺激对其进行处理。萤光素酶活性(以任意单位报告, A.U.)在处理起始 6 小时后, 利用萤光素酶分析试剂盒(Promega, Madison, WI)和 Berthold 发光计进行测定。结果根据转染效率和蛋白浓度进行校正。

电泳位移分析

在处理后的细胞中提取细胞核。使用 $[\delta\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 标记双链 DNA NF- κ B 共有序列 (GGGGACTTTCCC (SEQ ID NO:1))；Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 并和 5mg 总核蛋白一同保温。一些保温是在抗 p65/RelA 的抗体或抗 p50 (Santa Cruz Biotech) 的抗体存在的条件下进行的, 以便评估超位移 (supershift)。电泳位移分析 (EMSA) 如 Taylor 等 (J.Biol.Chem.273:15148-15156(1998)) 所述进行。

免疫印迹分析

对培养基或肝匀浆物中的原代肝细胞进行 Western 印迹分析, 利用以下物质的抗体: iNOS (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky; 1: 1000), HO-1 (Calbiochem, 1: 2000), 或 β -肌动蛋白 (Sigma Chemical; 1: 5000)。来自细胞培养实验的 30 μ g 蛋白或来自肝匀浆的 100 μ g 蛋白上样各孔中进行 SDS-PAGE。

组织学/免疫组化

为进行组织学和免疫组化分析, 将肝固定在 2% 的多聚甲醛中, 并随后在液氮中迅速冷冻。随后对肝进行切片 (7 微米厚), 并用苏木精和伊红 (H&E) 进行染色。肝切片还使用试剂盒 (Promega) 根据产品说明进行 TUNEL 和活化 caspase-3 染色。用于 iNOS 免疫组化分析的切片用 5% 山羊血清 (含 0.2% 牛血清白蛋白) 封闭。随后, 将所述切片在室温和抗 iNOS 抗体 (Transduction Laboratories, 1: 300) 一起保温 1 小时, 然后进行洗涤并用二级抗体 (与 Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR) 偶联) 进行检测 (probe)。细胞核用 Hoechst 染料染色。利用 Olympus Provus 显微镜获得图像。培养物中的肝细胞铺于凝胶化的盖玻片上, 如需要进行刺激, 且随后在 2% 的多聚甲醛 (含 0.1% 的 Triton X-100) 中固定。封闭和染色步骤与对肝切片的相似, 只是利用的是抗-p65/RelA 抗体 (Santa Cruz Biotechnology; 1: 350)。

CO 暴露

所述动物暴露于 CO (浓度 250ppm)。简言之, 将空气中的 1% 的 CO 与空气 (含 21% 氧气) 在不锈钢圆柱混合器中进行混合, 然后以 12L/分的流速将混合物导入 3.70 ft³ 玻璃暴露小室中。利用 CO 分析仪 (Interscan, Chatsworth, CA) 持续测定所述小室中的 CO 水平。使 CO 水平一直保持在 250ppm。按需要将小鼠置于暴露小室中。

HO-1 防止肝损伤

研究了 HO-1 是否防止急性肝衰竭。结果显示于图 1。将钴原卟啉 (5mg/kg, 腹腔内) 给药雄性 C57BL/6J 小鼠。24 小时后, 将 TNF- α /D-gal(分别为 0.3 μ g/8mg/小鼠, 腹腔内) 给药小鼠。在给药 TNF- α /D-gal 8 小时后测定小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。HO-1 的诱导防止肝损伤, 如测定的血清 ALT 水平所示。

外源性 CO 保护肝细胞

研究了外源性 CO 是否在体外防止肝细胞死亡。结果显示于图 2 和图 3。为获得图 2 所示的数据, 将小鼠肝细胞与 CO(250ppm) 共同预孵育 1 小时(所有试验的标准预处理时间), 然后加入 TNF- α /Act-D(分别为 10ng/200ng/ml)。在实验过程中一直将细胞保持在 CO 中。12 小时后, 如 Kim 等所述(J.Biol.Chem.272:1402-1411(1997)) 测定细胞生存力。腺病毒实验涉及将肝细胞和 10 pfu/细胞的腺病毒共同保温过夜, 然后加入 TNF- α /Act-D, 随后使用结晶紫测定生存力。信号分子鸟苷酸环化酶和 p38 MAPK 的作用也在该模型中进行研究。为评估 cGMP 的作用并确定 NF- κ B 的作用, 分别用可溶的鸟苷酸环化酶(sGC)抑制物 1H-(1,2,4)-恶二唑啉并-(4,3-a) 喹啉-1-酮(ODQ; Calbiochem; 2-10 μ M) 或 NF- κ B 抑制物 BAY 11-7082(10 μ M) 处理肝细胞。用所述抑制物处理细胞 1 小时, 然后用 CO 预处理 1 小时。然后加入 TNF- α /ActD 并在 12 小时后测定所述细胞生存力。当 cGMP 不参与时, NF- κ B 活化对于 CO 激发的保护作用非常重要。暴露于 CO 导致与没有暴露于 CO 相比, 细胞死亡明显减少(*P<0.01)。

为获得图 3 所示的数据, 将来自供体的切除肝的人原代肝细胞用 CO 和 TNF- α /ActD 如上述进行处理。

使原代小鼠, 大鼠和人肝细胞暴露于 CO 抑制 TNF- α 诱导的凋亡。肝细胞凋亡的抑制不依赖于 cGMP 的生成, 这是由于选择性鸟苷酸环化酶抑制物 ODQ 不能逆转 CO 提供的保护作用(图 2)。此外, CO 处理在 SB203580(3-30 μ M, Calbiochem)(p38 MAPK 活化的选择性抑制物) 以及 p38 的显性上游激酶(在来自 *mkk3*^{-/-} 小鼠的肝细胞中)(数据未显示) 存在下, 抑制细胞死亡。因此, CO 的作用不依赖于 cGMP/p38 MAPK 途径。在这些实验中, 肝细胞用 CO 预处理 1 小时, 然后将 TNF- α /Act-D 加入培养基。如果 CO 处理在加入 TNF- α 后开始, 观察到的保护作用较小(数据未显示)。

NF- κ B 在 CO 保护作用中的作用

研究了 CO 诱导的对肝细胞的保护作用是否依赖于 NF- κ B。图 4, 5 和 6A-6C 显示的数据说明, CO 诱导小鼠肝细胞中 NF- κ B 核易位以及 DNA 结合的增加, 如 NF- κ B 萤光素酶报道物分析活性(EMSA)所测, 以及免疫染色 RelA/p65 核易位所分别测定的那样。

为获得图 4 中的数据, 对 NF- κ B 活化的评估是利用如 Chow 等 (J.Biol.Chem.274:10689-10692(1999))所述的萤光素酶报道物分析进行的。简言之, 肝细胞用 NF- κ B 报道物构建体和 pIEP-Lac-z 共转染 24 小时, 然后加入 BAY 11-7082(10 μ M)或载体(vehicle)。将细胞保温 1 小时后用 CO(250ppm)处理。萤光素酶活性(以任意单位报告; A.U.)在暴露于 CO 或细胞因子混合物(CM)6 小时后测定, 该细胞因子混合物由 TNF- α (500U/ml), IL-1 β (100U/ml), 和 IFN- δ (100U/ml)组成, 并用作 NF- κ B 活化的阳性对照。结果根据转染效率和蛋白浓度进行校正。

为获得图 5 的数据, 利用 EMSA 测定 CO(250ppm)处理的肝细胞中的 NF- κ B DNA 结合。注意到 NF- κ B 结合(总)随时间增加, 其表达在 1 小时(泳道 1, 4, 7)达峰值。随后对提取物进行超位移分析, 以利用抗 p50 的抗体(泳道 2, 5, 8)和抗 p65 的抗体(泳道 3, 6, 9)鉴定不同的 NF- κ B 二聚体。

为获得图 6A-6C 的数据, 将原代肝细胞暴露于 CO(250ppm)一小时后进行免疫染色以测定核 p65 定位。图像显示在 CM(用作阳性对照)和 CO 处理的细胞中 NF- κ B 的核易位(指向绿色细胞核的箭头显示了 NF- κ B 的易位), 与此相比在空气处理的细胞中没有定位(指向蓝色细胞核的箭头)。NF- κ B 萤光素酶报道物实验活性在将所述细胞置于 CO 环境中 1 小时后达到峰值。细胞因子混合物(CM)包含在处理组中作为阳性信号以及最大报道物活性的标准(通过其评估 CO 的效应)。原代肝细胞中的转染效率不明显, 而其报道物活性非常显著(与对照相比 * $p < 0.001$)。这些数据结合阳性免疫染色以及 EMSA 结果支持了 CO 诱导 NF- κ B 的适度增加本身就可部分导致选择性基因表达这一观点。为评估 NF- κ B 活性是否为 CO 介导的保护作用所需, 利用 I κ B α 的腺病毒基因转移来预防 NF- κ B 易位并用 BAY 11-7082(1-10mM, Calbiochem)来抑制 NF- κ B 的活化。CO 的保护效应通过抑制 NF- κ B 的活化而被消除。

NF- κ B 依赖的 iNOS 表达在 CO 保护作用中的作用

研究了CO介导对肝细胞的保护是否需要iNOS的表达以及NO的生成。所述结果表示在图7, 8和9中。

为获得图7中的数据, 利用萤光素酶报道物实验如Lowenstein等所述(Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 90:9730-9734(1993))对iNOS的表达进行评估。简言之, 用iNOS启动子报道物构建体和pIEP-LacZ共转染肝细胞, 然后将所述细胞暴露于BAY 11-7082(10mM)或载体。细胞和BAY一同保温1小时后暴露于CO(250ppm)。如上述测定萤光素酶活性(以任意单位报告; A.U.)。细胞因子混合物(CM;见上文)用作诱导iNOS表达的阳性对照, 并且根据转染效率和蛋白浓度校正结果。

10 为获得图8的数据, 利用免疫印迹技术评估iNOS蛋白的表达。简言之, 在存在或缺失CO(250ppm)的条件下, 用TNF- α /Act-D处理肝细胞的细胞提取物6-8小时。对照细胞用单独的空气或CO处理。注意图8中, TNF- α 诱导的iNOS的表达最低, 而用TNF- α 在存在CO的条件下处理的细胞显示对iNOS蛋白的诱导明显更高。

15 为获得图9的数据, 从*inos*^{-/-}或野生型C57BL/6J小鼠中分离小鼠肝细胞, 并随后用L-NIO(1mM)预处理所述细胞1小时以在给药CO前抑制iNOS。使暴露于CO的组接受一个小时的预处理, 然后向其中加入TNF- α /Act-D, 并随后再进行CO暴露。在其中iNOS的表达缺失或被抑制的细胞中, CO没有对细胞起保护作用(如12小时后通过结晶紫排除法(crystal violet exclusion)所评估)。

20 在iNOS萤光素酶报道物实验中, 将肝细胞暴露于CO导致活性显著增高(图7)。再次将细胞因子混合物用作这些低效率转染中的阳性对照, 并作为标准来评价CO的效应。与iNOS表达的NF- κ B依赖性一致, 在用BAY 11-7082处理的肝细胞中观察到报道物活性降低(图7)。此外, 与单独存在TNF- α 相比, 在CO存在时, 由对TNF- α 的反应而产生的iNOS蛋白明显增加(图8)。利用来自iNOS敲除小鼠(*inos*^{-/-})的肝细胞和用选择性iNOS抑制物L-NIO(1mM, Calbiochem)处理的野生型小鼠肝细胞, 申请人研究了在缺乏iNOS活性的条件下, CO是否防止TNF- α 诱导的细胞死亡。CO不能防止缺乏iNOS活性的肝细胞不受TNF- α 诱导的细胞死亡, 而其对野生型肝细胞则有保护作用(图9)。总而言之, 这些数据显示, CO需要NF- κ B的活化和iNOS表达以防止肝细胞在体外死亡。

吸入的 CO 防止肝衰竭

在爆发性肝衰竭的 TNF- α /D-gal 模型中研究了吸入 CO 是否防止肝损伤。结果显示在图 10 和 11A-11H 中。

为获得图 10 的数据，用 CO(250ppm)预处理小鼠一小时，然后用 TNF- α /D-gal(分别为 0.3 μ g/8mg/小鼠；腹膜内)处理。接受 TNF- α /D-gal 处理后，小鼠回到 CO 暴露小室中，并且 6-8 小时后分析其血清的 ALT。没有暴露于 CO 的情况下，肝衰竭出现在 6-8 小时内，主要由上述体外模型中的肝细胞凋亡造成。CO 处理的小鼠的血清 ALT 比暴露于空气的小鼠的血清 ALT 低 74%。

10 为获得图 11A-11H 的数据，在存在或缺乏 CO(250ppm)的条件下，对取自 TNF- α /D-gal 处理 8 小时的小鼠的肝样品进行切片，并进行以下染色：苏木精和伊红(H&E)，活化 caspase-3(如红色强度增加所示)，以及 TUNEL 阳性细胞(如增强的绿色细胞染色分界所示；细胞死亡的标志)。细胞核染成蓝色。暴露于 CO 显著降低了 TNF- α /D-gal 诱导的肝损伤(如 H&E 染色所示)。
15 暴露于 CO 的小鼠的肝也显示 TUNEL 阳性细胞较少，显示活化 caspase-3 的染色较少，并具有正常的结构(architecture)。接受 TNF- α /D-gal 的暴露于空气的对照小鼠显示明显的肝炎症，水肿，出血以及结构丧失。

上述讨论的结果用脂多糖(LPS，也称为内毒素)替代 TNF 来证实。在这些证实性研究中，给药 LPS/D-gal 导致血清 ALT 水平从对照的 20 \pm 5IU/ml
20 升高到 >1000IU/ml(如给药 LPS/D-gal 8 小时后所测)。在用 250ppm CO 预处理的小鼠中，ALT 的升高降低了 75%，为 250 \pm 75IU/ml。为进一步说明在该模型中观察到的 CO 的效应，测定血清白介素-6，并发现呼吸 CO 的动物与呼吸空气的对照相比其血清白介素-6 降低了 65%(数据未显示)。这些小鼠的肝组织的组织病理学与使用 TNF- α /D-gal 处理的小鼠的相似。未处
25 理的和 CO 处理的小鼠(无 LPS/D-gal)没有任何损伤迹象，而用空气和 LPS/D-gal 处理的小鼠显示明显的损伤，包括水肿，出血，嗜中性细胞浸润，以及正常形态和结构的总体破坏。反之，用 CO 以及 LPS/D-gal 处理的小鼠的肝和用 CO 以及 TNF- α /D-gal 处理的小鼠的肝受到保护的程
30 度相同。在炎症标志物(水肿，出血，嗜中性细胞浸润)中几乎观察不到改变。其结构保持，且显示与未处理的和 CO(无 LPS/D-gal)处理的小鼠中很相似。总之，使用 LPS/D-gal 诱导急性肝炎对应并证实了使用 TNF/D-gal 处理所得的数据。

iNOS 在 CO 预防肝损害的保护作用中的作用

利用免疫印迹技术和免疫组化研究了用 TNF- α /D-gal 处理后, 暴露于 CO 的小鼠的肝中 iNOS 蛋白的水平是否增加。此外, 研究了 CO 是否保护 *inos*^{-/-}小鼠或用选择性 iNOS 抑制物 L-NIL(10mg/kg, 腹膜内; 每两小时给药) 处理的野生型小鼠, 以确定 iNOS 表达是否具有功能性作用。结果显示为图 12, 13A-13D, 和 14。

为获得图 12 的数据, 用空气或 CO(250ppm)处理雄性 C57BL/6J 小鼠一小时, 然后给药 TNF- α /D-gal(分别为 0.3 μ g/8mg/小鼠; 腹膜内)。6 小时后, 收获肝以通过免疫印迹来评估 iNOS 表达。结果显示 iNOS 表达在空气 TNF- α /D-gal 处理的小鼠中轻度(modestly)增加, 但在用 TNF- α /D-gal 和 CO 处理的小鼠中明显增加。如预期那样, *inos*^{-/-}小鼠显示不表达 iNOS 蛋白。

为获得图 13A-13D 的数据, 对小鼠肝切片进行 iNOS 表达的免疫染色。肝切片得自存在或缺乏 CO 时用 TNF- α /D-gal 处理的小鼠, 以及没有用 TNF- α /D-gal 处理的空气和 CO 对照。来自暴露于 CO 并没有接受 TNF- α /D-gal 处理的小鼠的肝显示 iNOS 表达轻度增加。然而, 在暴露于 CO 并接受 TNF- α /D-gal 处理的小鼠的肝中观察到所述表达明显大幅增加(表示为绿色染色细胞增加)。所述增加的表达显示定位在血管周围。

为获得图 14 的数据, 利用 *inos*^{-/-}或用 L-NIL(iNOS 的选择性抑制物 (L-NIL; 5mg/kg, 腹膜内, 每两小时给药)处理的野生型小鼠, 在缺乏 iNOS 活性的条件下, 检测 CO 诱导的保护的效率。L-NIL 在给药 CO 前两小时给药。随后预处理 CO 处理的动物(250ppm)一小时, 然后用 TNF- α /D-gal 处理。缺乏 iNOS 功能/表达的条件下, CO 不能防止肝不受损伤(如通过血清 ALT 和组织病理学评估的那样)。

因此, 可见吸入 CO 对 TNF- α 诱导的肝衰竭的保护效应有赖于 iNOS 活性。

HO-1 在 CO 防止急性肝衰竭的保护作用中的作用

研究了 CO 和 NO 是否通过 HO-1 依赖的机制显示预防急性肝衰竭的保护作用。数据显示于图 15,16, 17, 和 18。

为获得图 15 的数据, 进行免疫印迹以观察在存在或缺乏 CO(250 ppm) 时接受 TNF- α /D-gal 处理的小鼠的肝中 HO-1 的表达。在存在或缺乏 TNF- α /D-gal 的条件下, CO-处理的小鼠显示 HO-1 表达均明显增加。

为评估 iNOS 对 TNF- α /D-gal-诱导的 HO-1 在肝中的表达(数据显示于图 16 中), 将 L-NIL (5 mg/kg, 腹腔内)在给药小鼠, 2 小时后用 CO (250 ppm) 预处理, 并在此后每两小时处理一次。对照小鼠接受 L-NIL 并保持于室内空气。注意图 16 中, CO 增加载体处理的小鼠中的 HO-1 的表达, 但在 iNOS 受抑制时不能诱导表达。单独的 L-NIL 处理对 HO-1 的表达具有最小的影响。

为检验 CO-诱导的 HO-1 (数据显示于图 17)的保护性作用, 在用 CO 处理 5 小时前, 将 SnPP (50 pmol/kg, 皮下), HO-1 的选择性抑制物, 给药小鼠。可选地, 将 VPYRRO (VP), NO 供体(10 mg/kg, 皮下)给药小鼠。VP 被选择性设计为直接将 NO 递送到肝。最初的 VP 给药后一小时, 将动物暴露于 CO 一小时, 然后给药 TNF- α /D-gal (见上文)。在 6-8 小时后测定血清 ALT 水平。注意 CO 不能对其中 HO-1 活性被阻断的动物提供保护。当 VP 在 2 小时前给药, 并在其后每两小时给药一次时, 其对损伤提供保护作用, 如 8 小时后测定的血清 ALT 所示。

为获得图 18 的数据, 野生型 C57BL/6J 小鼠用 L-NIL(饮用水中, 4.5 mM) 预处理 24 小时, 如 Stenger 等(J. Exp. Med. 183: 1501-1514 (1996))所述。随后将 CoPP 给药这些小鼠和 *inos*^{-/-}小鼠。L-NIL 在整个试验过程中一直保持在水中。对照和 *inos*^{-/-}小鼠接受正常的饮用水。给药 CoPP 24 小时后, 将 TNF- α /D-gal 给药, 并在 6-8 小时后测定血清 ALT。注意图 18 中, 无论是否存在 iNOS, HO-1 的诱导都提供了保护作用。

在存在或缺失 TNF- α /D-gal 的条件下, 来自用 CO 处理的小鼠的肝提取物的免疫印迹显示 HO-1 的上调(图 15)。将 iNOS 抑制物 L-NIL 加入这些组消除了保护作用(图 17), 也阻止了 HO-1 的上调(图 16)。为测定 HO-1 对于 CO 激发的肝保护作用而言是否很重要, 锡原卟啉-IX (SnPP, 50 μ mol/kg, 皮下, Frontier Scientific)被用作 HO-1 活性的选择性抑制物。SnPP 显著降低该模型中 CO 的保护作用(图 17)。在缺乏 TNF- α /D-gal 时给药 SnPP 没有任何有害或保护性作用(数据未显示)。这些结果提示, HO-1 的上调对于 CO 的保护效应很重要。

为测定如果保护作用由 NO 启动, HO-1 的上调是否也是需要的, 用理学 NO 供体 V-PYRRO/NO 处理小鼠。该试剂在肝中代谢, 导致肝细胞释放 NO。V-PYRRO/NO 也在给药 LPS/D-gal 或 TNF- α /D-gal 后提供保护。将小鼠随机化, 并用 TNF- α /D-gal(有或没有 SnPP)处理以评估 HO-1 的作用。

V-PYYRO/NO 有保护作用(如血清 ALT 所分析)。但 SnPP 消除了该 NO 供体防止肝损伤的能力(图 17)。因此,似乎 CO-或 NO-启动的肝保护作用至少部分依赖于 HO-1。

5 由于这些数据显示, CO 和 NO 需要 HO-1 活性以防止 TNF- α -诱导的肝细胞死亡,研究了 HO-1 介导的保护作用是否需要 iNOS 活性。利用 *inos^{-/-}* 小鼠,通过给药 CoPP 诱导 HO-1。24 小时后(HO-1 表达高峰),注入 TNF- α /D-gal,并在 6-8 小时后评估肝损伤。所述结果显示 HO-1 的诱导能不依赖于 iNOS 活性而明显防止肝损伤,导致血清 ALT 降低 > 50%(图 18)。这些结果通过使用 L-NIL 证实。用含 L-NIL (4.5 mM)的饮用水预处理小鼠 24
10 小时。该方法有效抑制 NOS 活性。对照小鼠接受正常水。随后,将 CoPP 给药以诱导 HO-1 表达,并在 24 小时后,用 TNF- α /D-gal 攻击小鼠。单独的 L-NIL 治疗不改变该模型中诱导的损伤的严重性。所有接受 CoPP(有或没有 L-NIL)的动物中的肝损伤都可得到预防(图 18)。

研究了 HO-1 表达是否是 CO 或 NO 诱导的对 TNF- α /ActD-诱导的肝细
15 胞死亡的预防作用所需的。数据显示于图 19 和 20。

为获得图 19 的数据,从 HO-1 裸鼠(*hmox-1^{-/-}*)和野生型(C57BL/6J)同窝幼鼠中分离小鼠肝细胞,用 CO (250 ppm)预处理 1 小时,并用 TNF- α /ActD 进行处理。如上述测定生存力。CO 明显保护野生型肝细胞,但不能保护从 *hmox-1^{-/-}* 小鼠中分离的肝细胞。

20 为获得图 20 的数据,从 HO-1 裸鼠(*hmox-1^{-/-}*)和野生型(C57BL/6J)同窝幼鼠中分离小鼠肝细胞,用 NO 供体 SNAP(500 μ M)预处理 1 小时后用 TNF- α /ActD 进行处理。已经证实 SNAP 保护该模型中的肝细胞。SNAP 明显防止野生型肝细胞的细胞死亡,但不提供防止从 *hmox-1^{-/-}* 小鼠中分离的肝细胞出现细胞死亡的明显保护作用。

25 如上述,空气处理的野生型和暴露于 TNF- α /ActD 的 *hmox-1^{-/-}* 细胞如预期那样出现细胞死亡,而 CO-或 NO-处理的野生型细胞在 TNF- α /ActD 存在时受到保护(图 19 和 20)。CO 和 NO 显示的保护作用在缺乏功能型 HO-1(*hmox-1^{-/-}*)的细胞中丧失。因此,似乎 HO-1 在该模型中提供的保护作用与 iNOS 无关,表明 HO-1 或其一或多种催化产物可在该模型中部分显示
30 细胞保护作用。

吸入 CO 预防对乙酰氨基酚诱导的肝炎

研究了吸入的 CO 是否预防对乙酰氨基酚(APAP)-诱导的肝炎。数据显示于图 21。

为获得图 21 的数据, 给药 APAP (500 mg/kg, 腹腔内)一小时前或 4 小时后, 将雄性 C57BL/6J 小鼠暴露于 CO (250 ppm)。随后在整个实验过程中将小鼠保存在 CO 中。给药 APAP 20 小时后, 测定血清 ALT 水平。对照小鼠接受 APAP, 并保持在空气中。该方案的设计是在给药 CO 前让肝炎发展 4 小时。CO 明显减少对肝的损伤(如血清 ALT 测定所示(622 ± 44 对 175 ± 137 , 与对照相比 $p < 0.01$))。

所述保护与各组在给药 APAP 前已用 CO 预处理的动物中观察到的一样。这些数据支持了 CO 在临床相关情况中的治疗用途, 其中治疗可在肝炎开始后开始。

此实施例中讨论的结果显示, 在 CO 诱导的防止肝受到 TNF- α /D-gal 造成的损伤中, 低浓度的 CO 可防止 TNF- α /D-gal-诱导的爆发性肝炎, 并显示对 HO-1 和 iNOS 的独特且以前未认识到的依赖性。

不受理论所限, 可能 CO 介导的保护通过活化 NF- κ B, 其在存在炎性刺激条件下, 导致 iNOS 的上调以及随后的 NO 生成。除了诱导 iNOS 以外, 其它 NF- κ B 依赖的抗凋亡/保护基因也可被诱导。在用 CO 进行 1 小时的预处理的过程中以及用 TNF- α 处理所述细胞前, 存在 NF- κ B 的明显活化, 其可以是上述细胞器激发(priming)的一部分。CO 对 NF- κ B 的活化可能部分由于来自线粒体(初步观察)的反应性氧样品(species)生成的轻度增加。一个小时可能使得 NF- κ B 依赖的抗凋亡基因表达。这种假想模型中的下一步可能导致 iNOS 上调之后的 NO 生成。NO 导致 HO-1 上调, 其活性显示保护效应。HO-1 的保护效应可能是由于去掉了血红素, 或者由于其三种产物中的任何一或多种: CO, 胆绿素/胆红素, 或铁/铁蛋白。在整个实验过程中一直给药外源性 CO 的情况下, 似乎内源生成的 CO 不可能单独介导 HO-1 保护。然而, CO 与 HO-1 的其它产物的结合或单独的这些其它产物可能与此有关。

在上述研究中, 在临床相关的对乙酰氨基酚(APAP)诱导的肝炎模型中给药 CO, 该模型的时间过程与人的急性肝炎的发展相似。该数据显示, 给药 APAP(500mg/kg, 腹腔内)4 小时后暴露于 CO 导致肝损伤降低 62%(图 21)。在该 APAP-诱导的肝损伤模型中, 小鼠早在 APAP 给药 2-4 小时后就

显示了肝炎的症状，并在 24-48 小时后出现死亡。因此，在肝损伤开始后给药 CO。与 APAP 模型的数据一致的是出血性休克小鼠模型中的结果，其中 2.5 小时的休克期过后，复苏(resuscitation)过程中吸入 CO 治疗的开始产生对肝损伤的保护作用(24 小时血清 ALT 降低 > 65%， $p < 0.01$; $n=6-10$ /组)。

- 5 总之，利用主要由 TNF- α 诱导的凋亡造成的肝损伤模型，可证实以下结论：首先，吸入 CO 可防止该模型中的肝炎；其次，CO 的保护作用需要第二气体分子 NO 的生成；第三，NO 至少部分通过 HO-1 上调显示其有益效应；且第四，HO-1 的上调无需 iNOS/NO 活性，即无需循环的强制(obligate)持续即可起保护作用。

10

实施例 2: 治疗肝炎的方案

- 以下实施例阐述了用于处理诊断为患有肝炎的患者的方案。该实施例还阐述了在手术前，期间，和/或以后处理患者的方案，所述手术例如肝移植手术。熟练医师将理解本文所述任何方案可根据患者的个别需要进行调整，并可调整所述方案以和任何其它肝炎治疗联用。

15

治疗患者

- 用 CO 治疗患者可在患者被诊断为患有肝炎(例如由病毒感染和/或酗酒造成的肝炎)的当天开始。所述患者可由医师利用任何已知方法诊断。例如，以是可利用获自血液检测的数据进行这样的诊断，例如检测血清 ALT 水平的实验和检测患者是否被特定病毒(例如，任何已知的肝炎病毒)感染的实验。此外，医师可根据患者的病史作出这样的诊断(例如患者是否是嗜酒者或慢性药物使用者)。所述患者每天可吸入浓度为约 250-500 ppm 的 CO 一小时。这种治疗可持续约 30 天，或者直到所述患者被诊断为不再患有或不

25

再易患肝炎。

肝移植的方法

肝供体的处理

- 获取肝或其部分前，可使用吸入的一氧化碳(250ppm)处理供体一小时。给药处理的剂量可从 10ppm 到 1000ppm，时间从一小时到六小时，或者从

30

开始可能处理脑死亡(尸体)供体到该器官被取出的时间的整个阶段。对于人

类供体，宣布脑死亡后应尽早进行处理。在一些应用中，需要在脑死亡前进行处理。

- 对于非人动物(例如猪)用作异种移植供体的情况，如需要可用相对高水平的吸入的一氧化碳处理活供体动物，只要由此产生的碳氧血红蛋白不损害待移植器官的生存力和功能。例如，可使用高于 500ppm(例如，1000ppm 或更高，甚至达 10,000ppm，特别是短时间使用)的浓度。

肝的原位处理

- 从供体获取肝以前，可以在肝仍在供体体内时用溶液，例如缓冲液或介质对其进行冲洗或灌洗。目的是使用用一氧化碳饱和的溶液冲洗肝，并将肝保持在一氧化碳的环境中，使得一氧化碳的含量保持饱和。冲洗可进行至少 10 分钟，例如 1 小时，几小时或更长。较理想的是，该溶液将可能的最高浓度的一氧化碳递送到肝(或其一部分)的细胞。

肝的活体外(ex vivo)处理

- 将肝从供体取出后到将其移植给受体这段时间内，可将其保存在包含一氧化碳的介质中。这可通过将肝保存在含有一氧化碳的介质中进行，或者通过用这种介质灌注肝来进行。由于这种情况出现在活体外而不是动物体内，可使用非常高浓度的一氧化碳气体(例如，10,000ppm)使该介质被一氧化碳饱和。

处理肝受体

- 用一氧化碳处理受体可在移植手术当天手术开始前至少 30 分钟开始处理。可选地，可以于在受体内再灌注器官前至少 30 分钟开始。可持续至少 30 分钟，例如一小时。可将 10ppm 到 3000ppm 的一氧化碳剂量递送不同时间，例如数分钟或数小时，并可在移植当天和移植后数天给药。例如，所述患者可在三次连续 10 秒的深呼吸(breath hold)中吸入例如 3000ppm 浓度的一氧化碳。可选地，也可以采用规律呼吸而不是深呼吸的方式间断或连续地递送较低浓度的气体，递送较长时间。碳氧血红蛋白浓度可指导对患者适当地给药一氧化碳。通常，受体的处理不应导致碳氧血红蛋白水平升高到被认为可能给需要移植的患者造成可接受的危险的程度。

- 本发明描述了一些实施方案。但应理解可进行多种修饰而不偏离本发明的精神和范围。因此，其它实施方案也在权利要求的范围内。

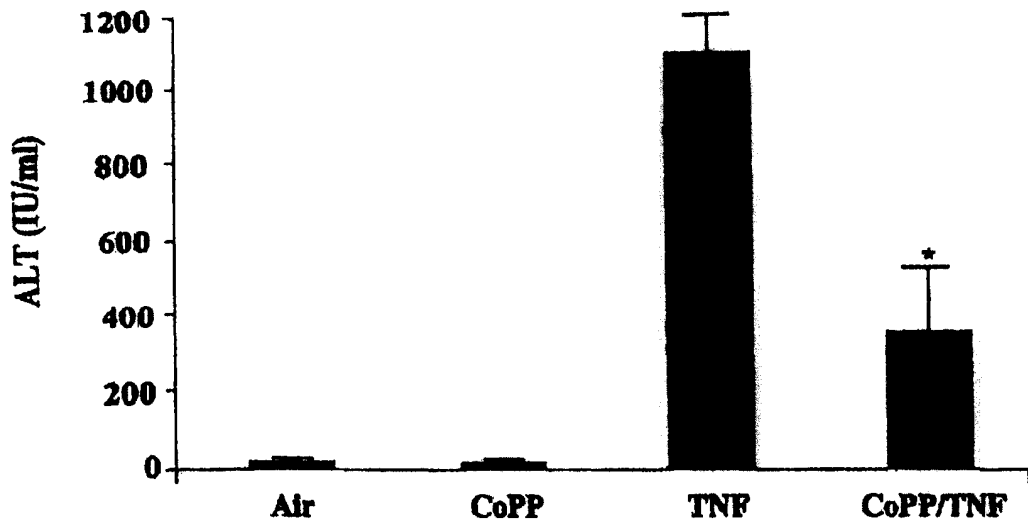


图 1

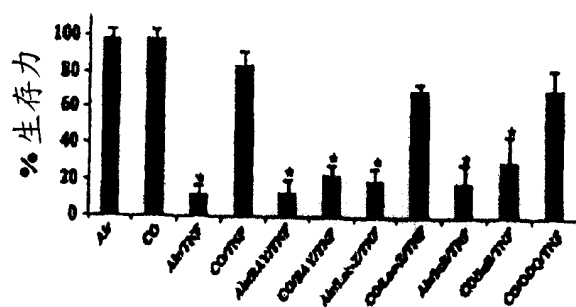


图 2

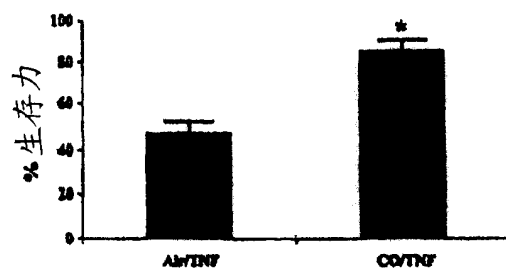


图 3

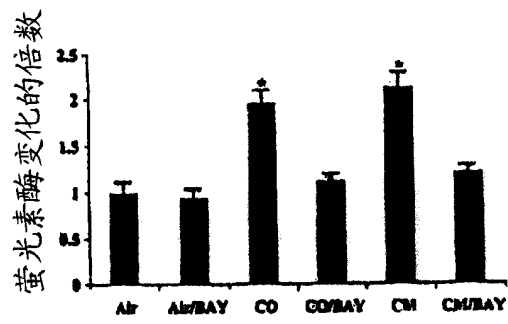


图 4

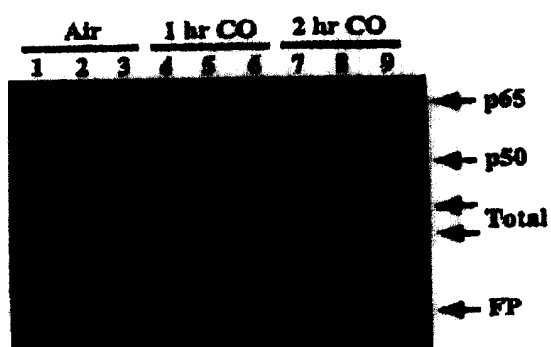


图 5

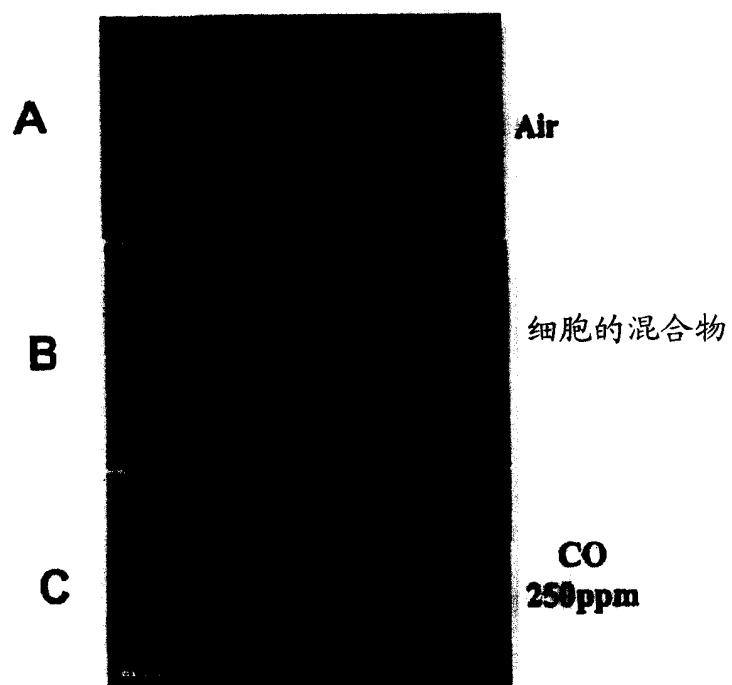


图 6A-6C

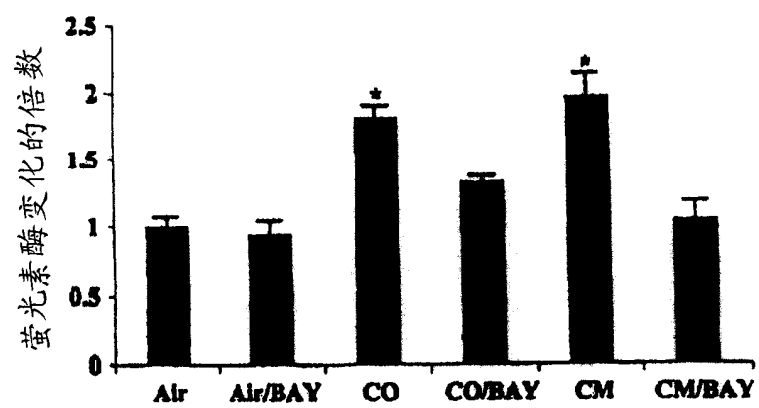


图 7



图 8

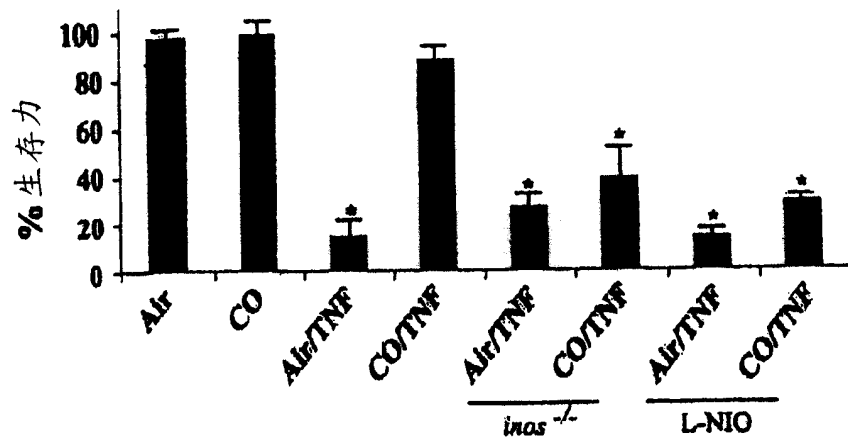


图 9

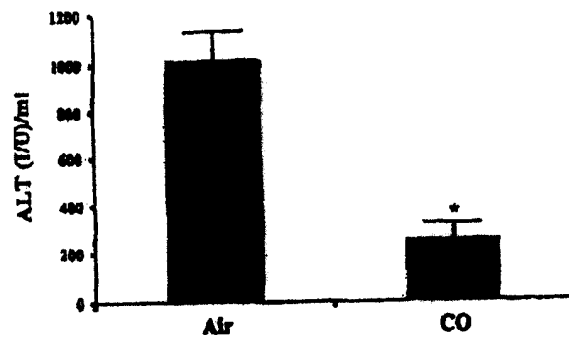


图 10

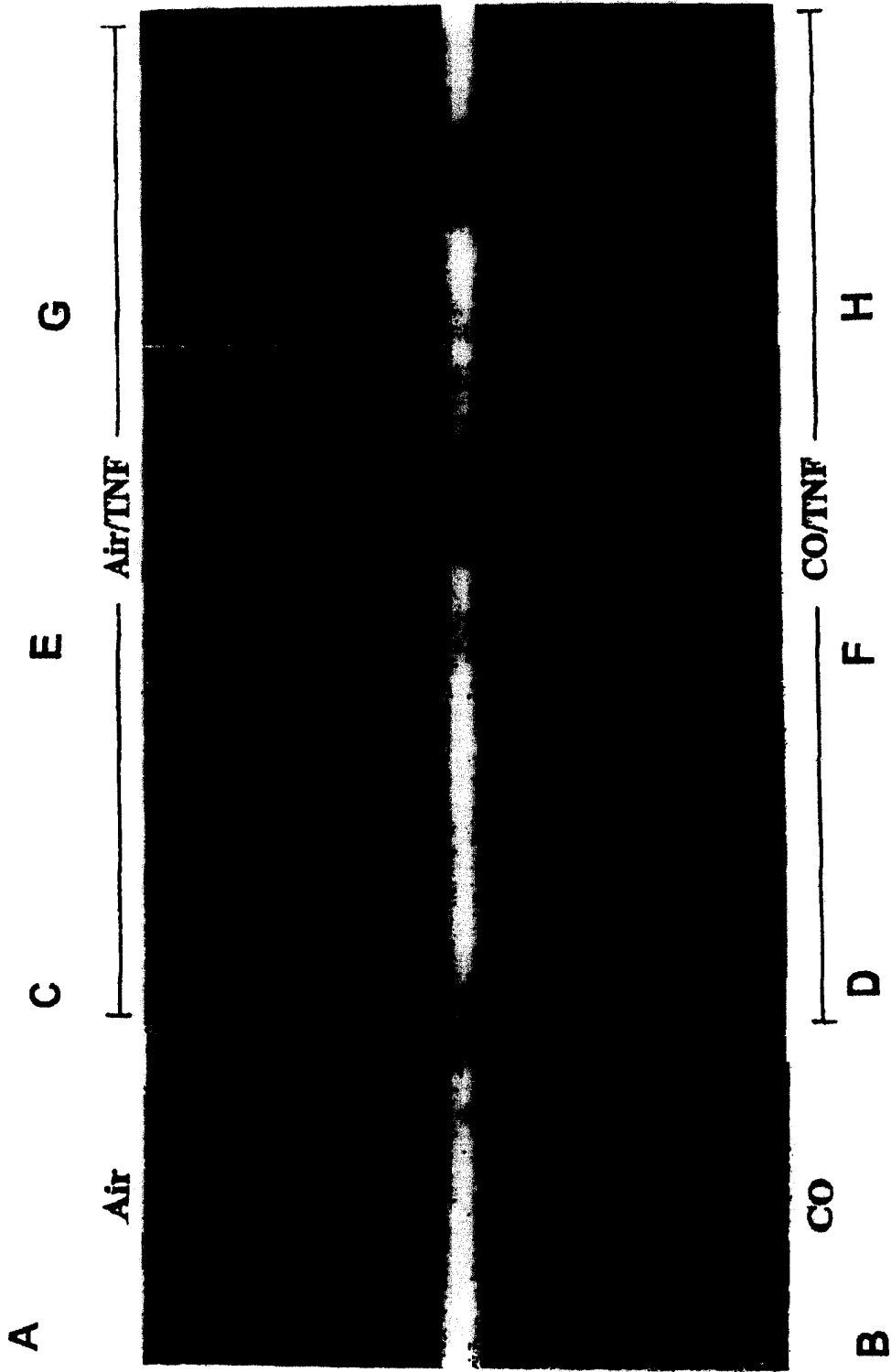


图 11A-11H

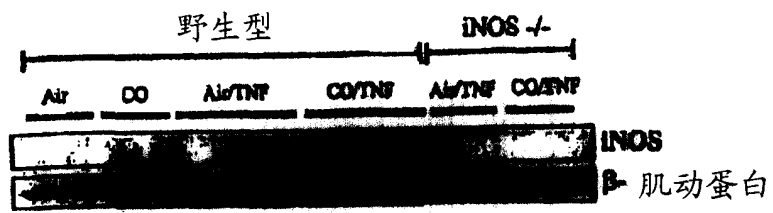


图 12



图 13A-13D

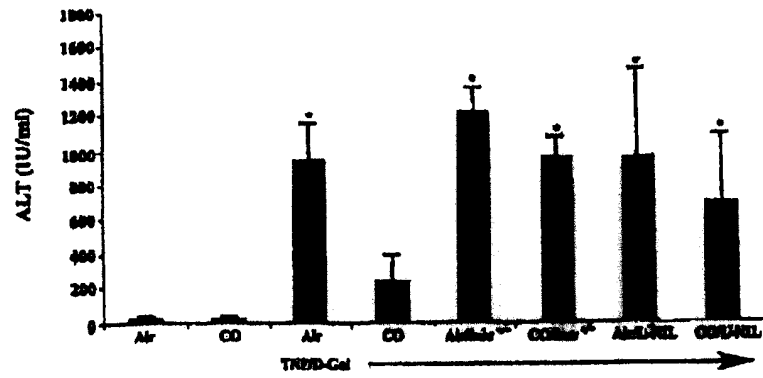


图 14

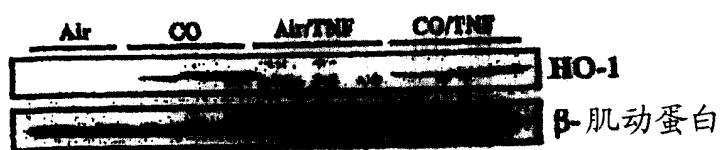


图 15

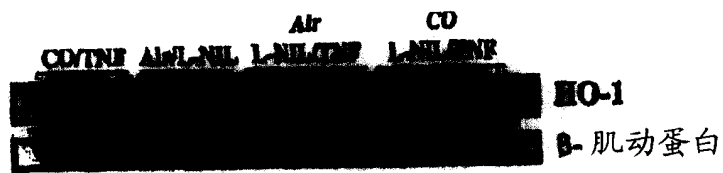


图 16

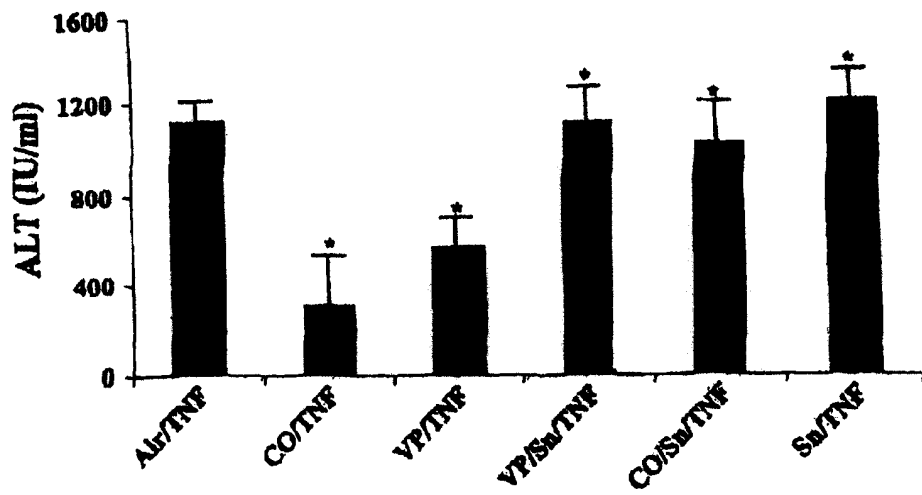


图 17

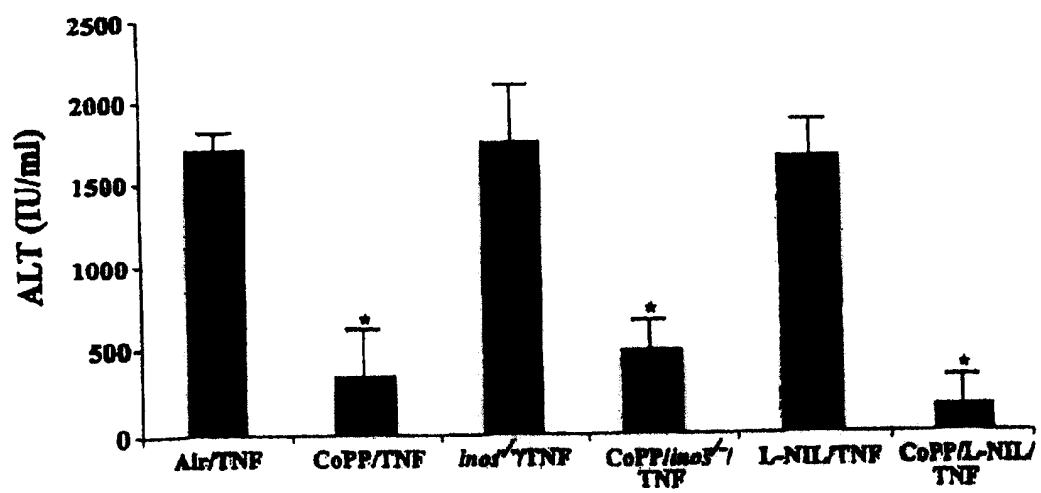


图 18

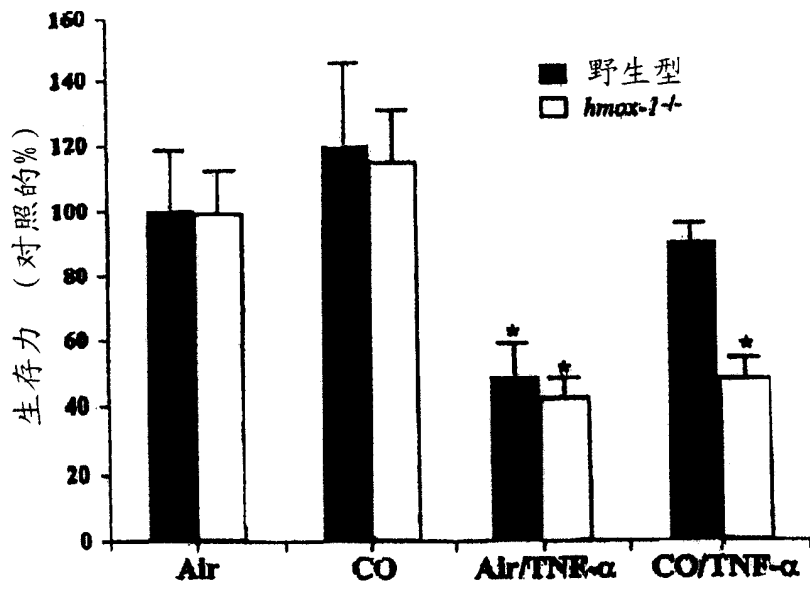


图 19

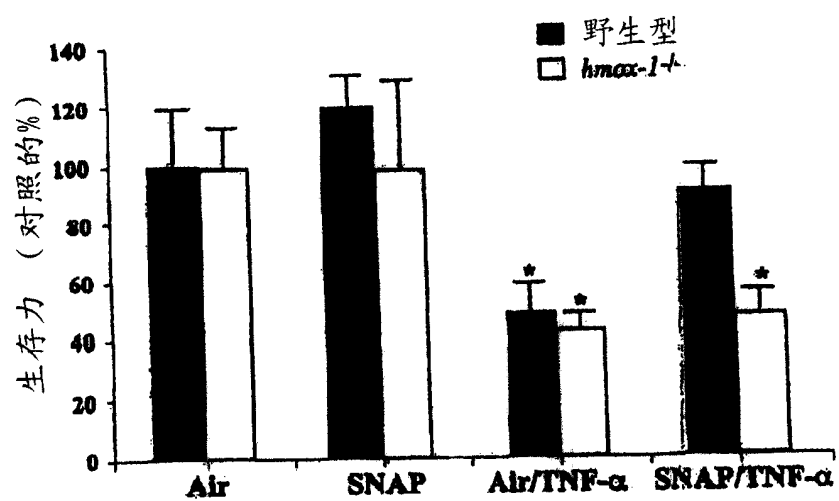


图 20

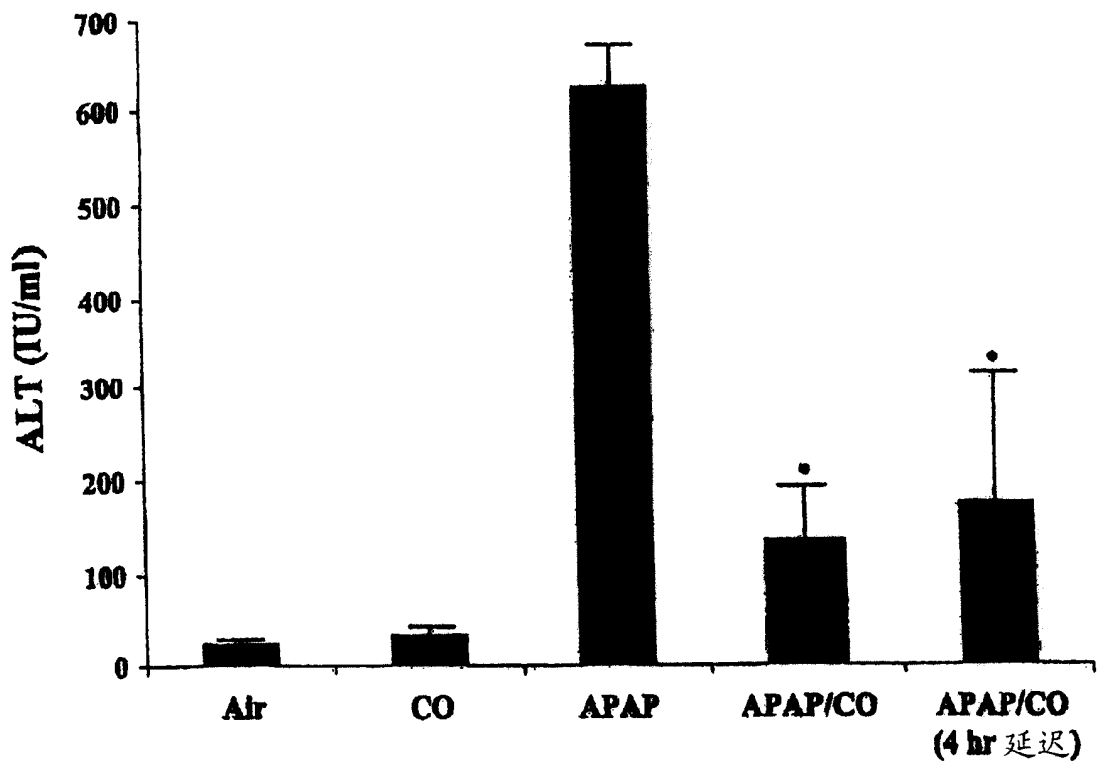


图 21